



CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853

动物学研究

ZOOLOGICAL RESEARCH

第33卷 第3期 Vol.33 No.3
2012年6月



中国科学院昆明动物研究所 中国动物学会 主办
科学出版社 出版

动物学研究（DONGWUXUE YANJIU）

第 33 卷第 3 期　　　2012 年 6 月

目　次

研究论文

研究报告

综述

封面说明：红嘴相思鸟 (*Leiothrix lutea*)　马晓锋　摄

[期刊基本参数] CN53-1040/Q * 1980 * b * A4 * 134* zh + en * P * ￥40.00 * 850 * 18 * 2012-06　http://www.zoores.ac.cn

动　物　学　研　究　2012，Jun. 33(3): 241−248　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03241

云南拉沙山黑白仰鼻猴交配行为和出生季节

王双金[1,#], 黄志旁[2,#], 和育超[3], 何晓东[4], 李东晖[4], 孙　军[4], 崔亮伟[1,*], 肖　文[2,*]

(1. 西南林业大学 云南省森林灾害预警与控制重点实验室, 云南 昆明　650224; 2. 大理学院 东喜玛拉雅资源与环境研究所, 云南 大理　671003; 3．云南省怒江州兰坪县云岭省级自然保护区, 云南 兰坪　671400; 4. 高黎贡山国家级自然保护区 怒江管理局, 云南 六库　673100)

摘要：灵长类的交配模式对于了解和掌握雄性的交配策略和社群的稳定机制非常重要, 但是目前有关亚洲灵长类交配模式的数据较少；因此，该研究于 2011 年 1—12 月, 分别采用全事件取样法和焦点动物−瞬时扫描取样法收集了拉沙山黑白仰鼻猴群的交配行为和出生数据。猴群全年交配, 有 2 个峰期, 一个是繁殖交配高峰期 (8 一 10 月); 另一个在出生季节, 但其非繁殖交配的生物学意义尚不清楚。雌性通过俯卧/注视雄性或跳落邀配。爬跨射精比为 8.8, 射精交配稀少 (11.4%), 这说明雄性并非每次交配都射精, 因而支持黑白仰鼻猴交配模式的主体为多次爬跨射精或处于从单次爬跨射精到多次爬跨射精连续谱上段的观点。雄性邀配的射精爬跨多于雌性, 说明多次爬跨射精不仅是雄性的一个交配策略, 而且可以决定交配模式在连续谱的位置。交配时间后延 6~7 个月, 交配频次与婴猴出生率相关。拉沙山猴群出生模式为严格的季节性, 这进一步证实了前人的观点。婴猴出生具有一定的同步性, 且不同猴群婴猴出生的同步模式不同。

关键词：黑白仰鼻猴; 交配模式; 交配行为; 出生季节
中图分类号：Q959.848;Q492.6　**文献标志码**：A　**文章编号**：0254-5853-(2012)03-0241-08

Mating behavior and birth seasonality of black-and-white snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) at Mt. Lasha

WANG Shuang-Jin[1,#], HUANG Zhi-Pang[2,#], HE Yu-Chao[2], HE Xiao-Dong[3], LI Dong-Hui[3], SUN Jun[3], CUI Liang-Wei[1,*], XIAO Wen[4,*]

(1. *Key Laboratory of Forest Disaster Warning and Control in Yunnan Province*, *Southwest Forestry University*, *Kunming*, *Yunnan*　650224, *China*; 2. *Institute of Eastern-Himalaya Biodiversity Research*, *Dali University*, *Dali*, *Yunnan*　671003, *China*; 3. *Yunling Provincial Nature Reserve*, *Lanping*, *Yunnan* 671400, *China*; 4. *Nujiang Administration Bureau*, *Gaolinggongshan National Nature Reserve*, *Liuku*, *Yunnan*　673100, *China*)

Abstract: Copulation patterns are important to understanding male mating strategies and stabilization strategies of social organizations in primates. However, information on copulation patterns of Asian primates is relatively rare. This study was undertaken to collect data on mating behavior and birth seasonality of Black-and-white Snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) using all occurrence sampling and Focal animal-scan sampling methods at Mt. Lasha, between January and December, 2011. Our study focused on observing mating frequency and birth rates. Snub-nosed monkeys mate year round, with two observable peaks: one reproductive peak during the mating season, roughly from August to October, and a second non-breeding peak during the birth season. It is unclear what biological significance this non-reproductive mating peak has. During our observation, we noted a lower ratio of mount to ejaculation and rare ejaculatory copulations, which indicated that every mating would not result in ejaculation. This study corroborates the previous view that the *Rhinopithecus bieti's* copulatory pattern is likely multiple-mount ejaculation (MME) or at the upper part of mating continuum of single-mount ejaculation (SME) toward MME. More ejaculatory copulations initiated by males than females indicate that MME is not only a mating strategy of males, but that males can influence the position of their copulatory pattern on the continuum between SME and MME. The mating frequencies significantly correlated

收稿日期：2012-02-03；接受日期：2012-03-27
基金项目：国家自然科学基金 (31160422, 30960084, 30960085); 云南省森林灾害预警与控制重点实验室 (ZK09A313); 云南省重点学科野生动植物保护与利用 (XKZ200904); 大理学院青年教师科研基金项目 (KYQN201123)
*通信作者(Corresponding authors), E-mail: Email: cuilw@yahoo.com; xiaowen.dali@gmail.com
#共同第一作者(Authors contributed equally to the work)
第一作者简介: 王双金(1986 一), 男, 硕士, 研究方向为灵长类行为生态学。E-mail：wsj2144584@163.com
黄志旁(1982—) , 男, 硕士, 研究方向为灵长类营养生态学、行为生态学和保护生物学。E-mail：huangzp1982@gmail.com

with the birth rates with a delay of 6 to 7 months. Monkeys gave birth within a strict seasonality with a birth peak of March, which confirms the previous view. Infants were born with a certain degree of synchronization, but different populations displayed different modes of synchronizations.

Key words: *Rhinopithecus bieti*; Copulatory pattern; Mating behavior; Birth seasonality

黑白仰鼻猴 (*Rhinopithecus bieti*, 俗名滇金丝猴) 隶属于灵长目猴科 (Cercopithecidae) 疣猴亚科 (Colobinae)仰鼻猴属 (*Rhinopithecus*), 是中国 I 级、特有珍稀濒危灵长类, 也是世界上分布海拔最高的非人灵长类之一。该物种仅分布于金沙江和澜沧江间的狭窄区域 (E98°37′～99°41′; N26°14′～29°20′), 由南到北依次隶属于行政区划上的云南省云龙、兰坪、丽江、维西、德钦及西藏芒康等 6 个县 (Long et al, 1994)。现存约 13 群, 1 500 ～1 700 只 (Xiao et al, 2003)。猴群栖息地海拔由北到南逐渐降低, 生境类型由以针叶树为主的暗针叶林渐变为针阔混交林, 其主食由松萝 (Kirkpatrick et al, 1998) 渐变为阔叶 (Ding & Zhao, 2004) 和竹叶 (Yang & Zhao, 2001)。黑白仰鼻猴的社会由多个一雄多雌单元 (one-male multiple- female unit: OMU) 和全雄单元 (all-male unit: AMU) 构成 (Cui et al, 2008; Kirkpatrick & Grueter, 2010; Kirkpatrick et al, 1998, Huang et al, 2012)。

灵长类交配模式二分为单次爬跨射精 (single mount-to-ejaculation: SME) (Caldecott, 1986; *Macaca* spp: Fooden, 1980; *N. larvatus*: Yeager, 1990) 和多次爬跨射精 (multiple mount-to-ejaculation: MME) (*C. badius* 和 *C. guereza*: Struhsaker, 1975) 或两者兼有 (Caldecott, 1986; *Macaca* spp: Fooden, 1980; *P. entellus*: Hrdy, 1977; *R. roxellana*: Ren et al, 1995)。笼养黑白仰鼻猴交配模式的主体为 MME 或处于从 SME 到 MME 交配模式连续谱的上段 (Cui et al, 2006)。尽管基于野生猴群的部分数据推测其交配模式为 SME (*n*=11, Kirkpatrick et al, 1998), 或是 SME 和 MME 并存 (*n*=8, Xiang & Sayers, 2009), 但是缺乏定量系统数据的支持。到目前为止, 疣猴亚科其他物种也未有交配模式的相关报道 (Asian colobines: Borries & Koenig, 2008; *R. bieti*: Huang et al, 2012; *Trachypithecus leucocephalus*: Jin et al, 2009; Qi et al, 2008; *R. roxellana*: Ren et al, 2002, 2003; *R. brelichi*: Yang et al, 2009)。黑白仰鼻猴交配模式信息仅源于笼养单个成年雄性, 缺乏代表性。此外, 由于观察条件的限制 (如观察距离远、林密、雨/雾大和猴群怕人等), 野生猴群繁殖特性的报道多基于零星的观察记录。经过系统考察发现拉沙山猴群是该物种目前较为理想的野生研究种群。通过对其的系统跟踪观察, 可以阐明黑白仰鼻猴交配模式, 有助于理解其交配策略。

拉沙山黑白仰鼻猴的出生期为 2 月 15—4 月 7 日, 且年间有变化 (如 2009 年出生时期为 2 月 21—4 月 2 日, 2010 年为 2 月 15—4 月 7 日) (Huang et al, 2012)。动物的繁殖受多种因素的影响和调控, 短期数据难以展示年际变化, 说明其繁殖季节性, 因此, 本研究将进一步验证拉沙山黑白仰鼻猴群的繁殖季节性。

1 研究地点和方法

1.1 地点

研究地位于云南省怒江州兰坪县云岭省级自然保护区拉沙山 (N26°20′, E99°15′), 行政区划隶属兰坪县啦井镇期井村。拉沙山最高峰海拔 3 854 m。目前, 拉沙山猴群已呈孤立状态：其家域被低海拔 (<2 800 m) 村庄和耕地以及>3 600 m 的高山牧场包围, 两者将猴群包围在海拔 2 900～3 600 m 的林带内。猴群活动区植被随海拔从低到高呈现带状分布, 依次为针叶林、针阔混交林、落叶阔叶林和暗针叶林 (Huang, 2009)。拉沙山地区最低月均温 4.4 ℃ (2 月), 最高月均温 17.5 ℃ (7 月)。5 一 10 月为雨季, 降水量，占全年的 79%; 11 月至翌年 4 月为干季 (Huang, 2009)。

研究对象为分布于黑白仰鼻猴分布区次南部 (与最南端的龙马山猴群直线距离约 10 km) 的拉沙山猴群。猴群由 11 个 OMU 和 1 个 AMU 组成, 种群大小约 130 只。猴群家域面积约 11 km^2。猴群生境斑块化明显, 家域内零星有牧场、火烧地和烧炭地 (砍伐栎树烧炭)。

1.2 方法

2011 年 1 一 12 月 (除 1 月雪大和 6 月雾大无法跟踪猴群外), 在猴群活动区对面的突出地点 (如

山脊和岩石), 借助单筒望远镜 (Nickon Fieldscope ED 60) 观察猴群, 当发现交配行为时, 采用全事件取样法 (all-occurrence) (Altmann, 1974) 记录交配数据 (包括发生时间、邀配者和接收者、邀配方式、交配持续时间、骨盆推进次数、有无干扰以及干扰者的年龄−性别以及交配后行为等), 累计观察时间 927 h。

交配行为包括邀配、爬跨、插入、骨盆推进、射精和交配结束 (Cui et al, 2006; Xiang & Sayers, 2009)。如果雄猴爬跨雌猴, 伴有骨盆推进, 则记为交配; 若只爬跨, 无骨盆推进, 不记为交配。骨盆推进停止后保持最大插入, 且有明显停顿 (≥3 s) 视为射精 (Cui et al, 2006)。

2011 年 2 月 16 日—4 月 12 日, 在猴群活动区对面的突出地点借助单筒望远镜采用焦点动物−瞬时扫描取样法记录猴群觅食或集体移动过程中 (如过沟和视野开阔地等) 婴猴 (1.5 月内均由母亲携带) 和成年雌猴数量, 统计婴猴和成雌数比值 (I/F: number of infants: number of adult females) (Altmann, 1974)。猴群包括 29 只成年雌性, 为避免成年雌性数量波动导致研究结果偏差, 当成雌数>15 时, 记录的 I/F 值才纳入统计 (Huang et al, 2012)。借助 I/F 值和婴猴数的变化, 可阐明猴群的出生模式 (Xiang & Sayers, 2009; Huang et al, 2012)。

1.3　数据分析

采用 Proportion test 检验雌雄两性邀配、雌性邀配方式以及雌雄两性邀配的射精爬跨间的差异。采用 *t*-test 检验交配参数差异。采用 goodness- of-fit test 检验交配季节性。通过 Circular statistics 分析出生季节性, 并采用 Rayleigh test ($Z=nr^2$) 检验出生模式 (Batschelet, 1981; Zar, 1999)。中位出生日期、平均出生日期及标准差的计算参照 Eisenberg et al (1981) 的方法。

2　结　果

2.1　交配频次

除 1 月 (雪大) 和 6 月 (雾大) 观察条件限制无法搜集数据外, 其他月份均观察到交配行为。2011 年共记录到 57 次交配, 其中完整交配 (从交配开始到结束) 44 次, 不完整交配 (漏掉交配的某个/些环节) 13 次 (表 1)。

2.2　邀配

雌性有两种邀配方式：(1) 俯卧并注视雄性 (PG: prostration and repeatedly glancing at the male), 即雌性跑到雄性面前, 腹部紧贴树干, 四肢完全弯曲、低头、臀部微微翘起, 不时 (扭头) 注视雄性片刻; (2) 跳落 (jumping: JP), 即雌性突然从高处跳/跑到雄性面前, 然后蹲伏或俯卧。

表 1　拉沙山黑白仰鼻猴观察时间和交配频次

Tab. 1　Mating duration and frequency of *Rhinopithecus bieti* at Mt. Lasha

月份 Month	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	总和 Total
时间 Duration (h)	0	71.5	77	89.5	78.5	0	80.5	83.5	110	72	145	121	927.5
交配次数 Mating frequency	0	1	3	4	3	0	2	8	15	12	7	2	57
完整交配 Complete mating	0	1	1	3	3	0	2	4	11	10	7	2	44
不完整交配 Incomplete mating	0	0	2	1	0	0	0	4	4	2	0	0	13

44 次完整交配记录中, 邀配 36 次, 雄猴直接爬跨 8 次。雌性邀配多于雌性 (75% vs 25%, Proportion test: Z=3.46, P<0.001)。雌性邀配 27 次, 其中 PG 占 59% (n=16), JP 占 41% (n=9), 雌性邀配方式无差异 (Proportion test: Z=0.98, P=0.16)。

2.3　直接爬跨

在无冲突发生和邀配行为的情况下, 雄性直接走到雌性身后抓抬雌性臀部随即爬跨, 并有骨盆推进。雄性直接爬跨 8 次, 占完整交配记录的 18% (n=44)。

2.4　交配

交配姿势为腹−背式：雄性从雌性后面爬跨, 两前肢抱住雌性胯部或后腰进行骨盆推进。保持俯卧状态的雌性摆动头部或以臀部为中心旋转身体上部。

交配对象可识别的 57 次交配中, 雄猴与成年雌性交配 54 次, 与青年雌性交配 3 次。射精与否可辨别的 44 次记录中, 5 次射精记录分布于 7—10 月 (7 和 9 月各 1 次, 8 和 10 月各 2 次), 占 11.4%。爬跨射精比为 8. 8。

雌雄邀配的爬跨时间和骨盆推进次数无差异, 但雄性邀配的射精交配多于雌性 (23.5% vs 3.7, n_1=17, n_2=27, Proportion test: Z=2.02, P=0.022)。射精爬跨骨盆推进次数和持续期多/长于非射精爬跨骨盆推进次数和持续期, 但不显著 (表 2)。

表 2 拉沙山黑白仰鼻猴交配参数

Tab. 2 Copulatory parameters of male *Rhinopithecus bieti* at Mt. Lasha

变量 Variable	平均值±标准差 (范围) mean±*SD* (range)	*n*	差异性检验 Test of difference
爬跨时间 Duration of mounts	12.7±3.1 (5−16)	44	
骨盆推进次数 Number of thrusts	9.8±2.6 (4−13)	44	
雌性邀配的交配爬跨时间 (s) Duration of mounts initiated by females	13.2±2.9 (5−16)	27	t_{42}=1.48, *P*=0.15
雄性邀配的交配爬跨时间(s) Duration of mounts initiated by males	11.8±3.2 (7−16)	17	
雌性邀配的交配骨盆推进次数 Thrusts in mounts initiated by females	10.1±2.5 (4−13)	27	t_{42}=1.15, *P*=0.25
雄性邀配的交配骨盆推进次数 Thrusts in mounts initiated by males	9.2±0.8 (5−13)	17	
射精爬跨骨盆推进次数 Thrusts in mounts with ejaculation	11.8±0.8 (11−13)	5	t_{42}=1.91, *P*=0.063
非射精爬跨骨盆推进次数 Thrusts in mounts without ejaculation	9.5±2.6 (4−13)	39	
射精爬跨持续期 (s) Duration of mounts with ejaculation	15.0±0.7 (14−16)	5	t_{42}=1.82, *P*=0.075
非射精爬跨持续期 (s) Duration of mounts without ejaculation	12.4±3.2 (5−16)	39	

t 值相邻两个交配参数间的差异采用 *t*-test 检验(Differences between two copulation parameters bordering upon *t* values were tested by *t*-test)。

2.5 性打搅

共记录到 4 次性打搅, 3 月和 4 月各 2 次。干扰个体均为 1 岁幼猴。曾观察到在交配过程中, 1～2 只幼猴会在交配者周边 1 m 内跳跃, 不时伸前肢抓雌性。但幼猴的干扰并未中断雌雄交配。交配后, 雄猴静坐, 雌猴离去, 其中小猴紧跟母亲后吃奶 1 次, 被拒 2 次; 小猴紧随母亲离去 1 次。

2.6 交配后行为

交配后梳理 11 次, 占 19.3% (*n*=57): 其中, 雌性梳理雄性 8 次, 占 73% (*n*=11); 雄性梳理雌性 1 次, 占 9%; 雄猴离去, 雌猴自我梳理 1 次; 雄性静坐, 雌性在其 1 m 内自我梳理 1 次。雄性原地静坐, 雌性离开 35 次 (61.4%); 雄性原地静坐, 雌性在雄性 1 m 内取食 7 次 (13.2%); 两者原地休息 1 次, 两者同时原地取食 1 次; 雌猴静坐, 雄猴离开 2 次。

2.7 交配季节

全年记录到 57 次交配。2—7 月交配频次低, 8 月逐渐增加, 10 月达到峰值, 随后逐渐降低。尽管猴群全年交配, 但并非均匀分布 (χ^2=35.11, goodness-of-fit test, *df*=9, *P*<0.001); 其峰期为 8—10 月 (图 1)。

2.8 出生季节

2011 年 2 月 19 日首个婴猴出生, 从 2 月 19 日—2 月 25 日, I/F 斜率逐渐增加说明婴猴出生渐多; 2 月 25 日—3 月 12 日, 斜率变缓, 表明新增婴猴数减缓; 3 月 12 日—18 日, 斜率增大, 说明婴猴出生增多; 3 月 18 日—4 月 12 日, 尽管 I/F 波动, 但婴猴继续出生, 且婴猴数在 4 月 12 日达到最大值 (13 只)。随后 I/F 和婴猴数虽波动, 但婴猴数一直稳定在 13 只, 表明 4 月 12 日出生结束 (图 2), 因此, 2011 年猴群新生婴猴 13 只, 出生期为 2 月 19 日一 4 月 12 日, 出生高峰为 3 月 (图 1)。

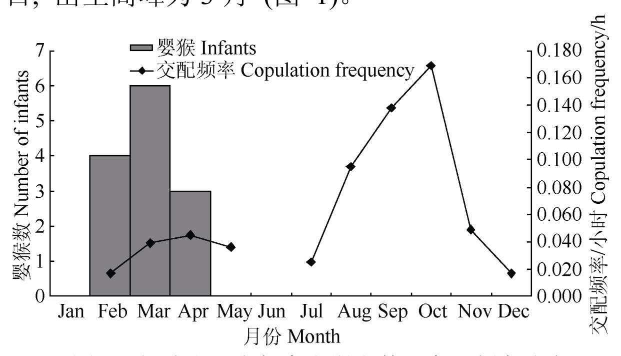


图 1 拉沙山黑白仰鼻猴婴猴数和交配频率分布

Fig. 1 Distribution of number of infants and mating frequencies of *Rhinopithecus bieti* at Mt. Lasha

1 月雪大、6 月雾导致无法跟踪猴群, 这两个月的数据缺失。It is impossible to track the monkeys in January due to snow and in June due to fog . No data exists for these two months.

拉沙山猴群出生模式为严格的季节性 (*r*=0.96, *Z*=12.01, *P*<0.001)。猴群平均出生期 3 月 22 日 (*SD*=16 d), 中位出生期 3 月 19 日。

拉沙山猴群第 1 周 (2 月 19 一 25 日)、第 4 和 7 周婴猴出生较多 (占 62%), 其他时间新生婴猴较

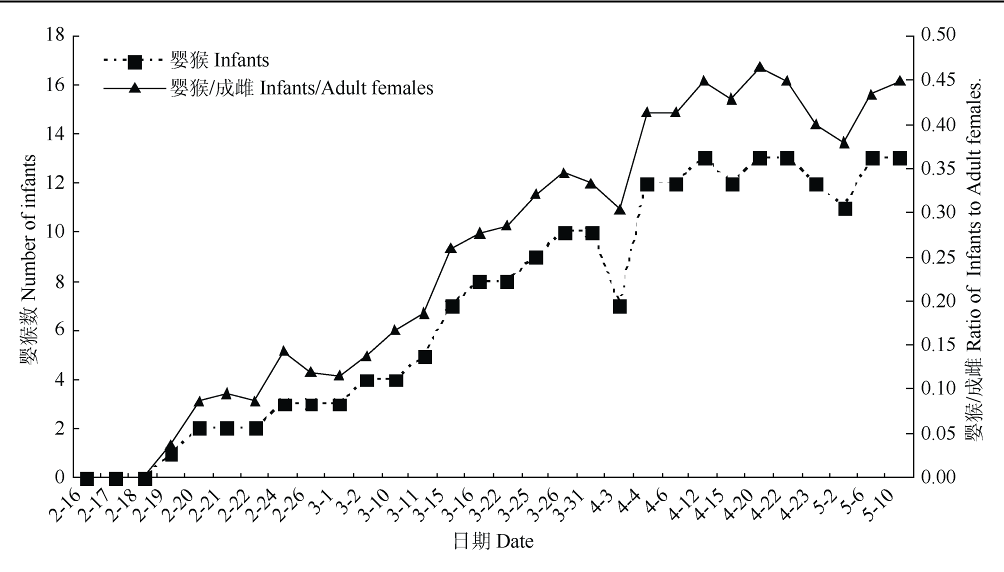


图 2　拉沙山黑白仰鼻猴婴猴/成雌比 (I/F)和婴猴数变化

Fig. 2　Change in number of infants and ratio of Infants to Adult Females (I/F) of *Rhinopithecus bieti* at Mt. Lasha

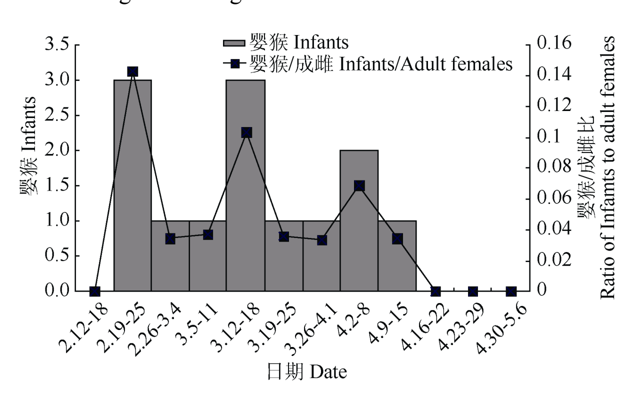


图 3　拉沙山黑白仰鼻猴每周婴猴/成雌比和新生婴猴数

Fig. 3　Number of infants and weekly variation in the ratio of infants to adult females (I/F) of *Rhinopithecus bieti* at Mt. Lasha

少, 第 9 周出生结束，因此，婴猴出生具有一定的同步性 (图 3)。

2.9　交配和出生的相互关系(时间后移)

交配时间后延 6~7 个月, 交配频次和婴猴出生率相关 (后延 6 个月：R^2=0.68, $F_{1,8}$=17.27, P=0.0032; 后延 7 个月：R^2=0.76, $F_{1,8}$=25.07, P=0.001)。

3　讨　论

3.1　交配季节

拉沙山黑白仰鼻猴全年交配, 有 2 个高峰期, 最高峰在交配季节；另一峰期在出生季节。这进一步证实了以前的报道 (Huang et al, 2012)。根据拉沙山猴群射精交配仅出现在交配季节 (7—10 月)、婴猴出生峰期 (2—4 月) 及其 195 d 的怀孕期 (Ji et al, 1998), 可以确定猴群繁殖交配峰期为 8—10 月, 这与仰鼻猴属其他物种的报道一致 (*R. bieti*: Cui et al, 2006; Kirkpatrick et al, 1998; Xiang & Sayers, 2009; *R. roxellana*: Zhang et al, 2000; Qi et al, 2008; *R. brelichi*: Yang et al, 2009), 但繁殖交配期外, 非受孕交配的生物学意义有待深入研究。

3.2　邀配

笼养黑白仰鼻猴雌性有 3 种邀配方式, 分别为俯卧并注视雄性、跳落和上下摆头 (Cui et al, 2006); 而在野生猴群中仅观察到前 2 种邀配方式 (Xiang & Sayers, 2009)。黑白仰鼻猴雌性以上下摆头的邀配方式 (Cui et al, 2006; Xiang & Sayers, 2009) 在其他物种中有报道 (*Nasaslis larvatus*: Yeager, 1990)。野生与笼养黑白仰鼻猴雌性邀配方式的差异可能与观察条件 (如林密和距离远等) 以及猴群/个体不同有关。总之, 黑白仰鼻猴雌性邀配方式与疣猴亚科其他物种典型的邀配方式基本一致 (*Pygathrix nemaeus*: Kavanagh, 1978; Lippold, 1998; *Presbytis entellus*: Newton, 1987; *R. roxellana*: Ren et al, 1995, 2002; *Colobus badius*: Struhsaker, 1975; *N. larvatus*: Yeager, 1990)。

笼养雄性以伴有特别叫声、露齿动颌表情邀配 (Cui et al, 2006), 这在疣猴亚科其他物种中亦有报道 (*P. nemaeus*: Kavanagh, 1978; Lippold, 1998; *R. roxellana*: Qi, 1988; Ren et al, 1995)。野生黑白仰鼻猴雄性以突然转向雌猴、瞪眼方式邀配 (Xiang & Sayers, 2009)。遗憾的是, 本研究未能准确、全面的观察到雄性邀配；因此, 也无法确认雄性的邀配方式。

交配中，雌性保持匍匐状态或以臀部为中心作前身的弧形移动，或仅左右摆动头部并有时停下回头注视雄性，或保持不动而注视前方 (Cui et al, 2006)。本研究观察到前 2 种雌性行为，而没有观察最后一种行为，因此，目前基本可以确定雌性的交配行为，但仍需进一步观察来确定是否还有其他的交配行为，是否具有个体/群体差异。

3.3 交配模式

笼养黑白仰鼻猴爬跨射精比为 5.2，单次爬跨射精约占 4.4% (Cui et al, 2006)。拉沙山猴群爬跨射精比为 8.8，射精交配稀少(11.4%)，这意味着雄性并非每次交配都射精。小昌都猴群也如此 (但缺乏定量数据支持) (Xiang & Sayers, 2009)，因此，黑白仰鼻猴交配模式的主体应为 MME 或处于从 SME 到 MME 连续谱上段 (Cui et al, 2006)。这与疣猴亚科其他物种的报道一致 (*Presbytis entellus*: Hrdy, 1977; *P. cristata*, *P. johnii*, *C. badius*, *C. guereza*: Hrdy & Whitten, 1987; *R. roxellana*: Ren et al,1995)。

除类人猿外的 53 种灵长类中，50%是 SME，43%是 MME (或"Serial")，而 7%的物种两者兼有 (Hrdy & Whitten, 1987)。*Macaca* 属的交配模式是从 SME 到 MME 的连续谱，而且，交配模式与雄性间的容忍度有关：SME 物种 (如 *M. radiata, M. sylvanus, M. sinica, M. arctoides* 等) 雄性间容忍度高、竞争不激烈且缺乏严格的社会等级, MME 物种 (如 *M. mulatta, M. fuscata, M. nigra* 和 *M. silenus* 等) 雄性间容忍度低、竞争激烈且有社会等级 (Shively et al, 1982)。Caldecott (1986) 认为雄性在松弛的社会环境中的交配模式是 SME，在敌对环境中则为 MME。

根据性选择理论 (Darwin, 1871; Trivers, 1972)，拉沙山猴群成年性比 (1M: 3F) 和体重性二型 (M/F≈2:1, Kirkpatrick, 1996) 暗示了以 OMU 为基本繁殖单元的雄性间有较强的交配竞争。拉沙山猴群雌、雄邀配的交配爬跨时间和骨盆推进次数无差异，但是雄性邀配的射精交配多于雌性，这说明 MME 不仅是雄性的一个交配策略，而且雄性可以决定交配模式在连续谱上的位置。另外，笼养黑白仰鼻猴雌性邀配的射精爬跨多于非射精爬跨暗示了雌性的激励对雄性的性觉醒是个积极因素，这意味着雌性的交配态度也会影响交配模式在连续谱的位置 (Cui et al, 2006; Zhao, 1993)。

拉沙山雄猴射精与非射精爬跨骨盆推进次数和爬跨时间无差异；但是，笼养雄猴射精爬跨时间和骨盆推进次数长/多于非射精爬跨时间和骨盆推进次数 (Cui et al, 2006)。这可能与竞争性社会环境压力大小不同有关：野生猴群社会竞争压力大，笼养猴群社会竞争压力小。

3.4 交配后行为

交配后雌性梳理雄性多于雄性梳理雌性 (73% vs 9%)，且雌性邀配导致的交配多于雄性 (75% vs 25%)，因此，雌性梳理雄性可能是对交配的一种回报 (Manson, 2004)。

3.5 出生季节

疣猴亚科灵长类出生模式有 3 种：严格的季节性、出生高峰期和无规律性 (Struhsaker & Leland, 1987)。绝大多数猴亚科灵长类出生具有严格的季节性 (Andelman, 1986)。拉沙山猴群出生模式为严格的季节性 (Huang et al, 2012)，且为脉冲型 (*SD*=16 d<30 d：Caughley, 1977)。野生黑白仰鼻猴猴群出生期为 2 月 15—4 月 12 日，峰期 3 月 (Huang et al, 2012; Kirkpatrick et al, 1998; Xiang & Sayers, 2009)。笼养黑白仰鼻猴出生于 12—6 月，峰期 3—5 月，平均出生期 4 月 18 日 (标准差 43 d)；尽管出生分散但具高峰期 (Cui et al, 2006)。黑白仰鼻猴群季节性繁殖的触发因素 (或近因 Proximate cause) 与光周期无关 (Cui et al, 2006; Huang et al, 2012)，而与气候和食物资源供给的季节性变化有关 (Huang et al, 2012)。

黑白仰鼻猴分布区次南部拉沙山猴群出生时间跨度 53 d，平均出生期 3 月 22 日 (*SD*=16 d)；中位出生期 3 月 19 日。而分布区次北端小昌都猴群出生跨度 39 d，平均出生期 2 月 28 日 (*SD*=3.6 d)，中位出生期2月24日 (Xiang & Sayers, 2009)，因此，黑白仰鼻猴的出生模式具有明显的趋异适应特征：北部猴群出生时间跨度比南部猴群短 13 d，提前 15 d 出生，平均出生期早 28 d，中位期提前 23 d，出生期标准差减少 12.4 d。黑白仰鼻猴南北部两个猴群家域纬度相差 3°，猴群出生相应提前、时间跨度缩短、出生期标准差减少约 2 周，中位出生期提前约 3 周，平均出生期提前 4 周。也就是说，随家域维度和海拔升高，出生季节性越显著。长尾叶猴家域纬度越高，其出生季节性越明显 (Newton & Dunbar, 1994)。峨嵋山藏猕猴 (*M. thibetana*) 猴群中位出生期随猴群家域海拔升高而提前 (Zhao & Deng, 1988)。黑白仰鼻猴群出生季节性随海拔升高而增强

可能与气候和食物供给季节性变化显著增强有关, 而具体的影响因素及其调控机制有待后续研究。

拉沙山猴群每周出生婴猴数不同, 小昌都猴群也如此 (Xiang & Sayers, 2009), 因此, 不同猴群婴猴出生的同步性模式不同：拉沙山猴群第 1 和 4 周出生婴猴最多, 第 7 周次之; 而小昌都猴群第 2 周最多, 依次为第 1 和 4 周 (Xiang & Sayers, 2009); 因此, 长期、系统的研究有助于阐明婴猴出生同步性模式的调控因素及其机制。

目前, 通常借助婴猴/成雌数比值 (I/F) 来研究难以进行个体识别灵长类种群的出生模式 (Xiang & Sayers, 2009; Huang et al, 2012)。由于野外跟踪和观察条件的限制, I/F 值波动较大, 有时造成结束期和出生模式的偏差; 如果同时考虑婴猴数, 就可以避免这种偏差, 得到真实的结果。在本研究中, 根据 I/F 比的最大值判定出生结束期在 4 月 20 日, 事实上, 婴猴最大值的首次出现日期 (4 月 12 日) 应该是猴群的出生结束期 (图 2)。

疣猴亚科中, 严格季节性出生种群的出生间隔接近 24 个月, 而出生具有高峰期和无固定规律种群的出生间隔接近 15 个月 (Newton & Dunbar, 1994)。2009 年, 拉沙山猴群 OMUs 有 24 只成年雌性, 其中 11 个产下婴猴; 2010 年 OMUs 有 27 个成年雌性, 其中 16 个产下婴猴 (Huang et al, 2012); 这说明另有 3 只雌性成年并产下婴猴。2011 年, 拉沙山猴群有 29 只成年雌猴, 出生婴猴 13 只。这意味着有 2 只雌性成年并生育后代, 因此, 猴群的出生间隔为 2 年。

致谢：云南省怒江州兰坪云岭省级自然保护区管理局的领导及工作人员给予了本研究大力支持; 野外工作得到了大山箐社区居民的帮助; 野外助手苏庆生和张金福协助完成了野外工作, 在此一并表示衷心感谢!

参考文献：

Altmann J. 1974. Observational study of behavior: sampling methods [J]. *Behav,* **49**(3): 227-267.

Andelman SJ. 1986. Ecological and social determinants of cercopithecine mating patterns [M] // Rubenstein DI, Wrangham RW. Ecological Aspects of Social Evolution. Princeton: Princeton University of Press, 201-216.

Batschelet E. 1981. Circular Statistics in Biology [M]. New York: Academic Press.

Borries C, Koenig A. 2008. Reproductive and behavioral characteristics of aging in female Asian colobines [M] // Atsalis S, Margulis SW, Hof PR. Primate Reproductive Aging: Cross-Taxon Perspective on Reproduction. Basel: Karger, 80-102.

Caldecott JO. 1986. Mating patterns, societies and the ecogeography of macaques [J]. *Anim Behav,* **34**(1): 208-220.

Caughley G. 1977. Analysis of Vertebrate Population [M]. New York: John Wiley and Sons.

Cui LW, Huo S, Zhong T, Xiang ZF, Xiao W, Quan RC. 2008. Social organization of black-and-white snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) at Deqin, China [J]. *Am J Primatol,* **70**(2): 169-174.

Cui LW, Sheng AH, He SC, Xiao W. 2006. Birth seasonality and interbirth interval of captive *Rhinopithecus bieti* [J]. *Am J Primatol,* **68**(5): 457-563.

Darwin C. 1871. The Descent of Man, and Selection in Relation to Sex [M]. London: John Murray, Reprinted in 1998.

Ding W, Zhao QK. 2004. *Rhinopithecus bieti* at Tacheng, Yunnan: diet and daytime activities [J]. *Int J Primatol,* **25**(3): 583-598.

Eisenberg JF, Dittus WPJ, Fleming TH, Green K, Struhsaker T, Trorington RW, JR. 1981. Techniques for the Study of Primate Population Ecology [M]. Washington: National Academy Press.

Fooden J. 1980. Classification and distribution of living macaques (*Macaca lacepede*) [M] // Lindburg DG. The Macaques: Studies in Ecology, Behavior and Evolution. New York: Van Nostrand Reinhold, 1-9.

Hrdy SB. 1977. The Langurs of Abu: Female and Male Strategies of Reproduction [M]. Cambridge: Harvard University Press.

Hrdy SB, Whitten PL. 1987. Patterning of sexual activity [M] // Smuts B, Cheney D, Seyfarth R, Wrangham R, Struhsaker T. Primate Societies. Chicago: University of Chicago Press, 370-384.

Huang ZP. 2009. Foraging Food Choice, Reproduction and Sleeping Site Selection of Black-and-white Snub-nosed Monkey (*Rhinopithecus bieti*) at the Southern Range [D]. Thesis, Southwest Forestry University, Kunming. [黄志旁. 2009. 黑白仰鼻猴 (*Rhinopithecus bieti*) 南部种群的摄食选择、繁殖及过夜地选择 [D]. 硕士学位论文, 西南林学院, 昆明.]

Huang ZP, Cui LW, Scott MB, Wang SJ, Xiao W. 2012. Seasonality of reproduction of wild black-and-white snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) at Mt. Lasha, Yunnan, China [J]. *Primates,* doi: 10.1007/s10329-012-0305-7.

Ji WZ, Zou RJ, Shang EY, Zhou HW, Yang SC, Tian BP. 1998. Maintenance and breeding of Yunnan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus [Rhinopithecus] bieti*) in captivity [M] // Jablonski NG. The Natural History of the Doucas and Snub-nosed Monkeys. Singapore: World Scientific, 323-335.

Jin T, Wang DZ, Zhao Q, Yin LJ, Qin DG, Ran WZ, Pan WS. 2009. Social organization of white-headed langurs (*Trachypithecus leucocephalus*) in the Nongguan Karst Hills, Guangxi, China [J]. *Am J Primatol*, **71**(3): 206-213.

Kavanagh M. 1978. The social behaviour of Doucs (*Pygathrix nemaeus nemaeus*) at San Diego Zoo [J]. *Primates,* **19**(1): 101-114.

Kirkpatrick RC. 1996. Ecology and Behavior of the Yunnan Snub-nosed Langur *Rhinopithecus bieti* (Colobinae) [D]. Dissertation. University of California Davis.

Kirkpatrick RC, Grueter CC. 2010. Snub-nosed monkeys: multilevel societies across varied environments [J]. *Evol Anthropol,* **19**(3): 98-113.

Kirkpatrick RC, Long YC, Zhong T, Xiao L. 1998. Social organization and range use in the Yunnan Snub-nosed Monkey *Rhinopithecus bieti* [J].

Int J Primatol, **19**(1): 13-51.

Lippold LK. 1998. Natural history of Douc langurs[M] // Jablonski NG. The Natural History of the Doucs and Snub-nosed Monkeys. Singapore: World Scientific Publishing, 191-206.

Long YC, Kirkpatrick CR, Zhong T, Xiao L. 1994. Report on the distribution, population, and ecology of the Yunnan snub-nosed monkey (*Rhinopithecus bieti*) [J]. *Primates*, **35**(2): 241-250.

Manson JPH, Navarrete CD, Silk JB, Perry S. 2004. Time-matched grooming in female primates? New analyses from two species [J]. *Anim Behav,* **67**(3): 493-500.

Newton PN. 1987. The social organization of forest hanuman langurs (*Presbytis entellus*) [J]. *Int J Primatol,* **8**(3): 199-232.

Newton PN, Dunbar RTM. 1994. Their ecology, behavior, and evolution [M] // Davies AG, Oates JF. Colobine Monkeys. Cambridge: Cambridge University Press, 311-346.

Qi JF. 1998. Observation studies on reproduction of golden monkey in captivity. I. Copulatory behavior [J]. *Acta Theriol Sin,* **8**(3): 172-175. [戚静芬. 1988. 人工饲养下金丝猴繁殖的观察研究 I. 交配行为. 兽类学报, **8**(3): 172-175.]

Qi XG, Li BG, Ji WH. 2008. Reproductive parameters of wild female *Rhinopithecus roxellana* [J]. *Am J Primatol,* **70**(4): 311-319.

Ren BP, Xia SZ, Li QF, Zhang SY, Liang B, Qiu JH. 2002. Male copulatory patterns in captive Sichuan snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) [J]. *Acta Zool Sin,* **48**(5): 577-584. [任宝平, 夏述忠, 李庆芬, 张树义, 梁冰, 邱军华. 2002. 圈养雄性川金丝猴交配模式. 动物学报, **48**(5): 577-584.]

Ren BP, Zhang SY, Xia SZ, Li QF, Liang B, Lu MQ. 2003. Annual reproductive behavior of *Rhinopithecus roxellana* [J]. *Int J Primatol,* **24**(3): 575-589.

Ren RM, Yan KH, Su YJ, Qi HJ, Liang B, Bao WY, De Waal FBM. 1995. The reproductive behavior of golden monkeys in captivity (*Rhinopithecus roxellana roxellana*) [J]. *Primates,* **36**(1): 135-143.

Shively C, Clarke S, King N, Schapiro S, Mitchell G. 1982. Patterns of sexual behavior in male macaques [J]. *Am J Primatol,* **2**(4): 373-384.

Struhsaker TT. 1975. The Red Colobus Monkey [M]. Chicago: University of Chicago Press.

Struhsaker TT, Leland L. 1987. Colobines: Infanticide by adult male [M] // Smuts BB, Cheney DL, Seyfarth RM, Wrangham RW, Struhsaker TT. Primate Society. Chicago: University of Chicago Press, 83-97.

Trivers RL. 1972. Parental investment and sexual selection [M] // Campbell B. Sexual Selection and the Descent of Man. Chicago: Aldine, 136-139.

Xiang ZF, Sayers K. 2009. Seasonality of mating and birth in wild black-and-white snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus bieti*) at Xiaochangdu, Tibet [J]. *Primates,* **50**(1): 50-55.

Xiao W, Ding W, Cui LW, Zhou RL, Zhao QK. 2003. Habitat degradation of *Rhinopithecus bieti* in Yunnan, China [J]. *Int J Primatol,* **24**(2): 389-398.

Yang MY, Sun DY, Zinner D, Roos C. 2009. Reproductive parameters in Guizhou Snub-nosed monkeys (*Rhinopithecus brelichi*) [J]. *Am J Primatol,* **71**(3): 266-270.

Yang SJ, Zhao QK. 2001. Bamboo leaf-based diet of *Rhinopithecus bieti* at Lijiang, China [J]. *Folia Primatol,* **72**(2): 92-95.

Yeager CP. 1990. Proboscis monkey (*Nasalis larvatus*) social organization: group structure [J]. *Am J Primatol,* **20**(2): 95-106.

Zar JH. 1999. Biostatistical Analysis [M]. 4th ed.. Prentice Hall, Upper Saddle River.

Zhang SY, Liang B, Wang LX. 2000. Seasonality of matings and births in captive Sichuan golden monkeys (*Rhinopithecus roxellana*) [J]. *Am J Primatol,* **51**(4): 265-269.

Zhao QK. 1993. Sexual behavior of Tibetan macaques at Mt. Emei, China [J]. *Primates,* **34**(4): 431-444.

Zhao QK, Deng ZY. 1988. *Macaca thibetana* at Mt. Emei, China. II. Birth seasonality [J]. *Am J Primatol,* **16**(3): 261-268.

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 249−254 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03249

北红尾鸲鸣唱句子内结构分化及利用其鸣唱识别个体

黄亚灵, 杨 青, 蒋 纯, 夏灿玮*

（北京师范大学 生命科学学院, 北京 100875)

摘要：鸣唱具有吸引异性和驱赶同性的功能, 受到性别间选择和性别内选择的共同影响。在少数鸟类中, 不同的句子或同一句子的不同部分分别侧重执行吸引异性和驱赶同性的功能, 句子的结构也相应的出现了分化。该研究于2011年繁殖季对北京小龙门地区32只北红尾鸲(*Phoenicurus auroreus*)的鸣唱分析发现, 其鸣唱的句子可以分为差异显著的两个部分：稳定部分和可变部分。这两个部分的语图相关变量在均值和变异系数上均有显著差异(配对样本 *t*-检验, $P<0.05$)。其中稳定部分在个体内非常保守, 而可变部分个体内存在较大的变化。在指出句子结构分化的基础上, 利用北红尾鸲鸣唱的稳定部分进行个体识别, 获得了较高的正确率。

关键词：北红尾鸲; 鸣唱; 稳定部分; 可变部分; 个体识别
中图分类号：Q959.739;S864;Q62 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0249-06

Two distinct parts within the song of *Phoenicurus auroreus*, and individual identification on the basis of the song

HUANG Ya-Ling, YANG Qing, JIANG Chun, XIA Can-Wei*

(*College of Life Science*, *Beijing Normal University*, *Beijing* 100875, *China*)

Abstract: Bird song has two key functions: attraction and competition. The structures of these songs have been shaped by both intra- and intersexual selection. Accordingly, there are some species that appear to use different parts of song to attract females and repel males. Alongside this functional separation, the structure of song can also have significant divergence. We studied the songs from 32 individuals of *Phoenicurus auroreus*, recorded in Beijing Xiaolongmen forest Park during the 2011 breeding season. The song of *Phoenicurus auroreus* consists of two distinct parts, a stereotyped and variable part. Significant differences between these two parts were observed between all the variables we measured. Based on the stereotyped part, the rate of correct individual identification is satisfactory, and most of songs can be correctly classified.

Key words: *Phoenicurus auroreus*; Song; Stereotyped part; Variable part; Individual identification

声信号是动物通讯交流的重要手段, 尤其在鸟类的生活史中起着重要的作用(Gill, 2007)。鸟类的发声可分为鸣叫(call)和鸣唱(song)两类。鸣叫通常简短而单调, 几乎所有鸟类都可以发出, 多用在特定的场合, 如乞食、报警; 鸣唱通常委婉而复杂, 多数为处于繁殖期的雀形目(鸣禽)雄鸟发出, 用以保卫领域、吸引配偶(Catchpole & Slater, 2008; Wang et al, 2003)。一般认为, 鸟类鸣唱的主要功能有：同性竞争和异性吸引。鹀属(*Emberiza*)、树莺属(*Cettia*)、苇莺属(*Acrocephalus*)、林莺属(*Dendroica*)等的部分鸟类, 可分别利用不同的鸣唱句子执行这两个功能(Brunner & Pasinelli, 2010)，并且伴随着句子功能的分化, 句子的结构也出现明显的差异，如日本树莺(*Cettia diphone*)用于自发鸣唱吸引异性的句子在哨音部分(whistle portion)音节数较少、音量较大, 而用于驱赶同性的句子在哨音部分音节数较多、音量较小(Park & Park, 2000); 芦鹀(*Emberiza schoeniclus*)吸引异性的句子与驱赶同性的句子在持续时间、复杂程度上有着显著差别, 吸引异性的句子结构相对简单，但持续时间更长(Brunner &

收稿日期：2011-12-26；接受日期：2012-04-06
基金项目：国家自然科学基金基础科学人才培养基金能力提高项目(野外实践) (J0830630/J0106)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: xiacanwei@126.com

Pasinelli, 2010)。

野外观测和回放实验证实, 多数情况下，雄鸟鸣唱的每个句子都可以同时起到同性竞争和异性吸引的作用(Kroodsma & Byers, 1991; Marier & Slabbekoorn, 2004)；但在同一个句子的不同部分是否存在功能上的分化, 即句子的不同部分分别编码同性竞争和异性吸引的信息, 目前实证还较少, 仅见于莺科(Sylviidae)少数鸟类(Collins et al, 2009; Fessl & Hoi, 1996)的报道。同一句子的不同部分分别执行同性竞争和异性吸引的功能, 受到性间选择(intrasexual selection)和性内选择(intersexual selection)的压力不同, 导致功能分化的同时也出现结构的分化(Collins et al, 2009)，如黑顶林莺(*Sylvia atricapilla*)句子前半部分侧重执行吸引异性的功能, 其频宽较大、结构复杂; 句子的后半部分主要执行驱赶同性的功能, 其频宽较窄、结构简单(Collins et al, 2009)。又如须苇莺(*Acrocephalus melanopogon*)句子起始部分传达同性竞争的信息, 结构相对简单, 而句子结尾部分侧重吸引异性, 其结构相对复杂(Fessl & Hoi, 1996)。

鸟类个体间由于遗传、发育和所处环境的不同, 导致了发声器官结构的细微变化或发声习惯的差异(Gilbert et al, 1994), 从而导致鸣声在传递信息的同时也表达出个体的特征(Fox, 2008)。野外研究发现，鸟类可以通过鸣唱对同种的不同个体进行识别, 如亲戚识别(Sharp et al, 2005)和邻居识别(Wei et al, 2011)。在研究中通过鸟类鸣声来识别和监测个体, 作为一种非损伤、低干扰性的标记方法, 也有着很广泛的应用前景(Terry et al, 2005), 如濒危物种保护(Delport et al, 2002)、生活史研究(Laiolo et al, 2007)、种群数量监测(Hartwig, 2005)等。

北红尾鸲(*Phoenicurus auroreus*)隶属于雀形目(Passeriformes)鸫科(Turdidae)红尾鸲属(*Phoenicurus*), 广布于欧亚大陆东部, 是我国华北地区常见的夏候鸟。该鸟喜筑巢于屋檐下的墙缝、农电土坎的凹陷处, 在繁殖季雄鸟常站在屋檐、电线、树梢等视野开阔处发出响亮的鸣唱(Cai, 1987; Wu, 1986)。为此，本文首先通过研究北红尾鸲的鸣唱特征, 着重突出该鸟鸣唱的语句内可分为结构差异显著的稳定部分(stereotyped part)和可变部分(variable part), 为进一步研究北红尾鸲鸣唱语句内功能的分化提供基础资料; 其次，在指出句子内结构分化的基础上, 尝试利用句子稳定部分进行个体识别(individual identification), 为更好地监测、研究该物种, 提供方法借鉴。

1 材料和方法

1.1 研究地区

野外工作在小龙门林场及其周边进行, 研究地位于北京西部门头沟区(N40°00', E115°26'), 属太行山脉小五台山余脉。夏季高温多雨, 冬季寒冷干燥, 为温带半湿润季风性气候。年平均降水量 500~700 mm, 年平均气温 2~7 °C。主要生境类型有农田、灌丛、落叶阔叶林、人工针叶林和亚高山灌丛草甸等(Qin et al, 2011; Xia et al, 2011b)。北京师范大学在该地区开展山地动物野外实习已近 30 年(1983—2011 年), 对其动植物资源有长期的积累资料。北红尾鸲为该地区夏候鸟, 巢筑于石隙、墙壁或林区房子内, 亦见于树洞或人工巢箱内筑巢。由于北红尾鸲在居民点附近分布集中, 所以挑选 4 个居民点(林场场部、小龙门村、齐家庄、洪水口村)进行野外声音采集工作。这 4 个居民点之间相距约 2～5 km。

1.2 野外工作

野外工作于 2011 年北红尾鸲的繁殖季进行, 其中 6 月 18—26 日调查研究点北红尾鸲的数量和分布, 6 月 27—29 日进行录音。采用 TASCAM HD-P2 便携式数字录音机(TASCAM, 日本),和 Sennheiser MKH416 P48 外接强指向性话筒(SENNHEISER ELECTRONIC, 德国)录音, 采样精度(sample width)设置为 16 Bit, 采样频率(sampling frequency)设置为 44.1 kHz(Xia et al, 2010)。为获得高质量的录音, 录音时距目标个体的距离<10 m。为避免假重复, 每个录音个体之间的距离相隔足够远(如位于不同的居民点), 或是能同时观测到多个鸣唱的个体, 以确保不会重复录音。共获得了 32 只个体清晰可供分析的录音。其中林场场部 6 只, 小龙门村 11 只, 齐家庄 10 只, 洪水口村 5 只。

1.3 声音量化

利用 Goldwave5.25 声音处理软件(GoldWave Inc, 加拿大)过滤 1 kHz 以下背景噪音, 并以 22.05 kHz 重新采样。利用 Avisoft-SASLab Pro 5.1.09 software 声音分析软件(Avisoft Bioacoustics, 德国)生成语图, 参数设置为：快速傅里叶变换(FFT length)=256 points, 哈明窗口(Hamming window), 帧长(frame size)=100%, 重叠(overlap)=50%, 频率分辨率(frequency resolution)=172 Hz, 时间分辨率

(time resolution)=2.9 s。参照 Qu et al, (2011)和 Xiao et al, (2008)的研究，本文中使用的鸣声术语如下。

音素(note)：语图上表现为一段连续的曲线，是鸣唱的最基本单位。

句子(song)：包含多个音素的连续段落，句子间通常有明显的间隔。

仿照 Lindholm & Linden(2007)的声音量化方法，我们对每个北红尾鸲挑选 10 句连续的录音进行测量。测量的变量包括句子的持续时间(t_{Dur})、句子的音素数(N_b)、句子的最高频率(F_{max})、句子的最低频率(F_{min})、句子起始的频率(F_{sta})、句子结尾的频率(F_{end})。在发现北红尾鸲鸣唱的句子可分为稳定部分(stereotyped part)和可变部分(variable part)(详细介绍见本文结果部分)后，为了比较这两个部分结构的差异，我们分别测量了这两部分的持续时间(t_{Dur_s}，t_{Dur_v})、最高频率(F_{max_s}，F_{max_v})、最低频率(F_{min_s}, F_{min_v})、音素数(N_{b_s}, N_{b_v})以及两部分之间的间隔时间(t_{Int})。我们还分别计算了整个句子以及稳定部分和可变部分的频宽(F_{band}，F_{band_s}，F_{band_v})(最高频率与最低频率的差值)。共 18 个变量(图 1)。

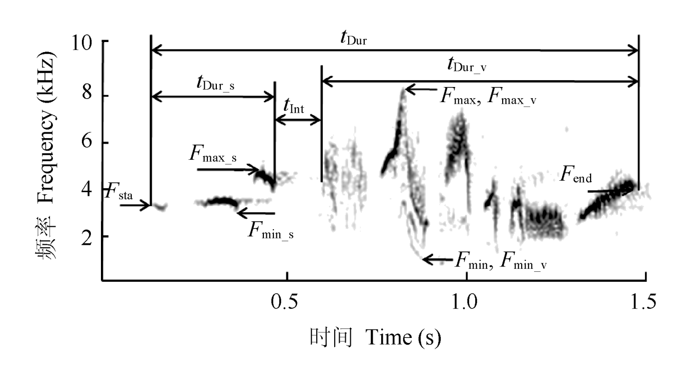


图 1　测量变量的示意图

Fig. 1　Method of measuring the variables

1.4　数据分析

计算变量在个体内的均值和变异系数。在北红尾鸲鸣唱特征的描述性统计时，利用每个个体的均值和变异系数计算总体的均值和平均变异系数。在确定所有变量均符合正态分布后(单样本 *K-S* 检验，P>0.05)，利用配对样本 *t*-检验，比较稳定部分和可变部分相关变量的差异。

为了进一步探究稳定部分和可变部分在个体内和个体间变异的差异，仿照 Xia et al(2011a)的研究，我们使用了语图比较分析(spectrographic cross-correlation)。语图比较分析通过比较两段语图的结构计算出这两段声音的相似性系数，该系数介于 0 至 1 之间，数值越高相似性越大。相比于通过测量变量量化声音的分析方法，语图比较分析可以更全面的利用声音的信息。首先，32 个个体的每个个体截取 10 句清晰的语图，并将其分为稳定部分和可变部分，共计获得 640 段语图(10×2×32)；然后分别对稳定部分和可变部分进行相似性计算，语图间两两比较，共获得 102 080 个相似性系数(2×320(320-1)/2)。最后利用双样本 *K-S* 检验比较个体内语图相似性系数和个体间语图相似性系数的分布差异。按照我们的观察句子内的稳定部分在个体内不同语句间变异很小，我们预测在分布上稳定部分的相似性系数在个体内和个体间会有明显差别，且个体内的相似性系数数值更大。

利用语句稳定部分的语图比较分析结果进行鸣声的个体识别研究。首先计算句子识别到个体的正确率。采用刀切法(Jack-knifed)的过程，每个句子依次选取一次作为待识别的句子。计算待识别的句子与某一个体发出的所有句子(不包括待识别句子本身)相似性系数的均值，做为该待识别句子与该个体的相似性系数。将该待识别句子归类到相似性系数最高的个体。比较该待识别句子实际发出的个体与上述方法归类的个体是否一致，以检验句子识别到个体的正确性(Xia et al, 2011a)。输出结果为所有句子正确识别到个体的比率(Terry et al, 2005; Xia, 2010)。在计算句子识别正确率的基础上，我们进一步计算可以利用鸣唱正确识别的个体的比率。如果一个个体正确识别到该个体的句子数超过错误归类到任一其他个体的句子数，则定义该个体可以正确识别。输出结果为可以正确识别个体的比率。

语图比较分析利用 Avisoft-SASLab Pro 4.36 software 自带的 Corr32 模块执行；统计分析利用 R2.11.1 (R Development Core Team)完成。数据用“mean±*SD*”的形式表示。所有检验在 P<0. 05 时认为有显著差异。

2　结　果

2.1　北红尾鸲繁殖期鸣唱特征

北红尾鸲鸣唱句子的最高频率(6.66±0.44) kHz，最低频率(2.12±0.28) kHz，频宽(4.54±0.61) kHz，句子起始的频率(3.72±0.32) kHz，句子结尾的频率(3.51±0.50) kHz，句子持续时间(1.61±0.22) s，由(10.61±1.48) 个音素构成(表 1)。

表1 北红尾鸲的鸣唱特征

Tab. 1 Song characteristics of *Phoenicurus auroreus*

变量名 Variables(kHz)	均值 Mean	标准差 Standard deviation	最大值 Maximum	最小值 Minimum	样本量 Sample size
F_{max}	6.60	0.44	7.56	5.74	32
F_{min}	2.12	0.28	2.85	1.50	32
F_{band}	4.54	0.61	5.73	3.57	32
F_{sta}	3.72	0.32	4.15	2.74	32
F_{end}	3.51	0.50	4.66	2.57	32
$t_{Dur\ (s)}$	1.61	0.22	2.08	1.18	32
N_b	10.61	1.48	13.70	8.00	32

2.2 北红尾鸲鸣唱稳定部分和可变部分的差异

北红尾鸲鸣唱的句子可以分为结构差异明显的两个部分：稳定部分(stereotyped part)和可变部分(variable part) (图2)。其中稳定部分位于句子的前半段，持续时间(0.35±0.08) s，由(3.38±0.72)个音素构成；固定部分位于句子的后半段，持续时间(0.98±0.20) s，由(7.21±1.34)个音素构成；两者之间有(0.29±0.06) s的时间间隔。稳定部分和可变部分不仅在变量的均值上差异显著(配对样本 *t*-检验，$P<0.05$)，而且在变量的变异系数上也有明显差异(配对样本T检验，$P<0.05$)(表2)。如表2所示，可变部分在个体内的变异系数要显著大于稳定部分在个体内的变异系数。

语图比较分析结果可见，稳定部分在个体内的相似性系数(0.64±0.16)与个体间的相似性系数(0.35±0.15)在分布上差异显著(双样本 *K-S* 检验，$P<0.05$) (图3A)，两者均值之差为0.29。可变部分相似性系数在个体内(0.22±0.08)和个体间(0.19±0.06)的分布虽然差异也很显著(双样本 *K-S* 检验，$P<0.05$) (图3B)，但两者均值之差仅为0.03。

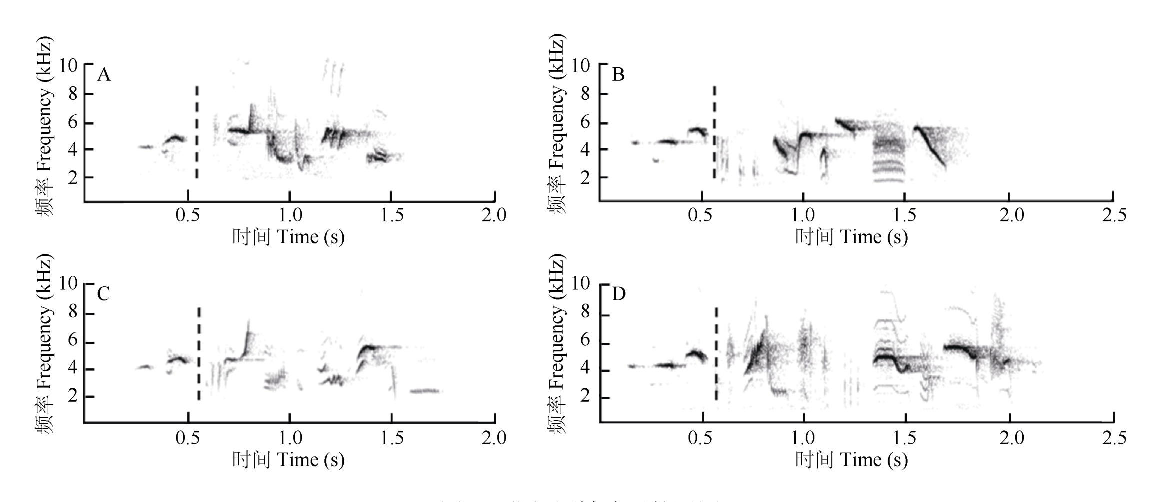


图2 北红尾鸲鸣唱的语图

Fig. 2 Spectrograms of *Phoenicurus auroreus*

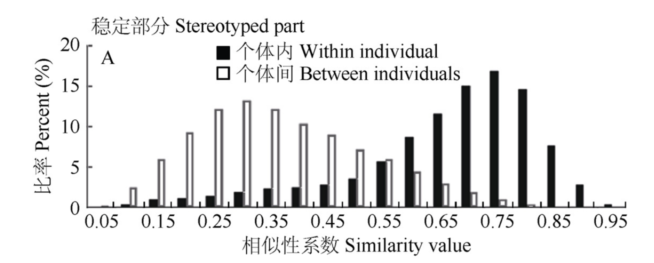
A、C由同一个体发出；B、D由另一个体发出；虚线之前的为句子的稳定部分,；虚线之后的为句子的可变部分。

A, C from one individual; B, D from another individual; the spectrograms before dashed line represent stereotyped part, while the spectrograms after dashed line represent variable part

表2 北红尾鸲鸣唱稳定部分和可变部分鸣声变量的比较

Tab. 2 Characteristics of stereotyped part and variable part of *Phoenicurus auroreus*

变量名 Variables (kHz)	均值±标准差 Mean±Standard deviation	配对样本 *t*-检验 Paired samples *t*-test	变异系数的均值 Mean of variation coefficient	配对样本 *t*-检验 Paired samples *t*-test	样本量 Sample size
F_{max_s}	5.21±0.22	$P<0.05$	0.03	$P<0.05$	32
F_{max_v}	6.58±0.48	(t=-14.53)	0.14	(t=-7.50)	
F_{min_s}	3.46±0.54	$P<0.05$	0.05	$P<0.05$	32
F_{min_v}	2.10±0.29	(t=13.98)	0.19	(t=-7.59)	
F_{band_s}	1.76±0.57	$P<0.05$	0.12	$P<0.05$	32
F_{band_v}	4.48±0.63	(t=-19.82)	0.22	(t=-4.87)	
t_{Dur_s} (s)	0.35±0.08	$P<0.05$	0.11	$P<0.05$	32
t_{Dur_v} (s)	0.98±0.20	(t=-17.42)	0.35	(t=-8.80)	
N_{b_s}	3.38±0.72	$P<0.05$	0.08	$P<0.05$	32
N_{b_v}	7.21±1.34	(t=-13.70)	0.34	(t=-8.84)	



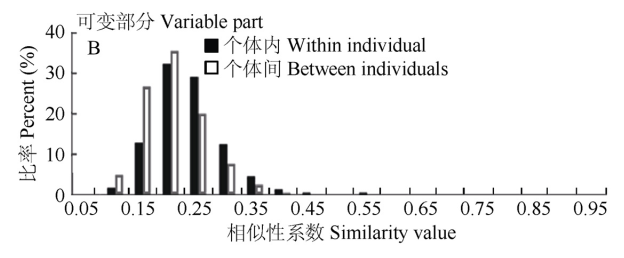


图 3　语图比较分析得出的鸣声相似性系数

Fig. 3　The similarity value calculated by spectrographic cross-correlation

2.3　利用鸣声个体识别

利用句子稳定部分进行个体识别, 有 234 句正确识别到发出的个体, 占句子总数(320)的 73.1%; 有 29 个个体正确识别到该个体的句子数超过错误归类到任一其他个体的句子数, 即可以利用鸣唱正确识别该个体, 占个体总数(32)的 90.6%。

3　讨　论

3.1　北红尾鸲繁殖期鸣唱句子内的结构分化

本研究发现, 北红尾鸲鸣唱的语句内存在结构差异显著的两个部分。稳定部分频宽窄、音素数少、持续时间短, 在个体内的不同语句间极少有变化、十分保守, 而可变部分频宽宽、音素数多、持续时间长, 在个体内的不同语句间, 无论从时间变量还是频率变量上看, 都有着极显著的变化(图 2、表 2)。鸟类鸣唱具有吸引异性和驱赶同性的作用, 其结构必将受到来自同性选择和来自异性选择压力的共同影响(Berglund et al, 1996; Catchpole & Slater, 2008; Marier & Slabbekoorn, 2004)。同性选择和异性选择对鸣唱结构的塑造方式在不同的鸟类中存在较大的差异(Byers, 2011; Byers & Kroodsma, 2009), 但通常认为复杂的鸣唱有利于吸引异性(Soma & Zsolt Garamszegi, 2011), 而简单的鸣唱有利于种内识别, 在驱赶同性中起到重要作用(Collins et al, 2009; Irwin, 2000)。须苇莺和黑顶林莺鸣唱的语句内也存在结构差异明显的两个部分, 其中结构简单的部分主要用来驱赶同性, 而结构相对复杂的部分主要用来吸引异性(Collins et al, 2009; Fessl & Hoi, 1996)。参照须苇莺和黑顶林莺的例子, 我们推测北红尾鸲鸣唱相对简单的稳定部分主要用于同性竞争, 而相对复杂的可变部分主要用于异性吸引。并提出以下预测 ：1) 北红尾鸲配对前(鸣唱更多的用于吸引异性)相比于配对后(鸣唱更多的用于保卫领域), 鸣唱的可变部分将更加复杂, 而稳定部分基本保持不变; 2) 删除句子内可变部分(屏蔽了异性吸引的功能), 在回放实验中仍可诱发雄鸟保卫领域的反应, 而不易吸引雌鸟靠近, 反之亦然。

3.2　利用北红尾鸲鸣唱的稳定部分进行个体识别

本研究利用北红尾鸲鸣唱的稳定部分进行个体识别, 73.1%的句子可以被正确识别到发出的个体, 90.6%的个体正确识别到该个体的句子数超过错误归类到其他个体的句子数：即利用鸣声可以较好地识别北红尾鸲个体。鸟类的鸣声往往同时要传达多重的信息, 如反映种间识别的信息(species information)、反映出生地的信息(local dialect)、反映个体质量的信息(quality information), 以及反映个体的信息(individual information)。利用鸣声进行个体识别已在过百种的鸟类中得到验证, 但个体特征是否可能相对集中的编码于鸣唱的某一部分, 目前关注的还较少(Fox, 2008; Terry et al, 2005)。Wegrzyn et al (2009)发现大苇莺(*Acrocephalus arundinaceus*)鸣唱语句的起始部分在个体内较为保守, 相对集中的体现了个体特征。本研究发现，北红尾鸲鸣唱的稳定部分在个体内十分保守, 并可以较好的进行个体识别, 丰富了个体特征可集中编码于鸣唱某一部分的实证。

在实际研究中应用鸣声个体识别, 还需要满足两个条件：1)鸣声个体性的特征需要保持时间上的稳定性; 2)随着个体数的增多, 鸣声识别的正确性仍然要足够高(Terry et al, 2005)。对于鸣声特征在时间上的稳定性, 在乌林鸮(*Strix nebulosa*) (Rognan et al, 2009)、蚁鸫(*Formicarius moniliger*) (Kirschel et al, 2011)等鸟类上已得到验证, 即用于短期区分个体的鸣声特征, 也可以很好的在较长的时间段上(繁殖季的不同时期, 或是不同的繁殖季)区分个体。北红尾鸲鸣声个体特征是否也可以保持时间上的稳定性, 还有待对于标记个体的长期监测。对于条件2)个体数量增多对鸣声个体识别正确性的影响, 对北红尾鸲的作用很有限。由于北红尾鸲喜欢在居民点附近占区、繁殖, 其个体数量必然受到居民点大小的限制, 在同一个居民点不易出现大量个体, 从

而影响鸣声个体识别正确率。由于居民点之间往往间隔数公里，而且鸟类在繁殖季有占有并保卫领域的习性，所以不同居民点间的北红尾鸲依据地理位置即可以做出初步的区分。

致谢：北京师范大学生命科学院张雁云教授在实验设计、数据分析和写作方面给予指导；匿名审稿人对文章的修改提出了宝贵意见，在此一并表示诚挚地谢意！

参考文献：

Berglund A, Bisazza A, Pilastro A. 1996. Armaments and ornaments: An evolutionary explanation of traits of dual utility [J]. *Biol J Linn Soc,* **58**(4): 385-399.

Brunner P, Pasinelli G. 2010. Variation in singing style use in the reed bunting *Emberiza schoeniclus*: Influencing factors and possible functions [J]. *J Avian Biol,* **41**(4): 388-397.

Byers BE. 2011. Birdsong, migration and sexual selection: a skeptical view [J]. *Anim Behav,* **82**(5): E1-E3.

Byers BE, Kroodsma DE. 2009. Female mate choice and songbird song repertoires [J]. *Anim Behav,* **77**(1): 13-22.

Cai QK. 1987. Birds of Beijing [M]. Beijing: Beijing Publishing. [蔡其侃. 1987. 北京鸟类志[M]. 北京：北京出版社.]

Catchpole CK, Slater PJB. 2008. Bird Song: Biological Themes and Variations. [M]. 2nd ed. New York: Cambridge University Press.

Collins SA, de Kort SR, Pérez-Tris J, Tellería JL. 2009. Migration strategy and divergent sexual selection on bird song [J]. *Proc R Socy B: Biol Sci,* **276**(1656): 585-590.

Delport W, Kemp AC, Ferguson JWH. 2002. Vocal identification of individual African wood owls *Strix woodfordii*: A technique to monitor long-term adult turnover and residency [J]. *Ibis,* **144**(1): 30-39.

Fessl B, Hoi H. 1996. The significance of a two part song in the moustached warbler (*Acrocephalus melanopogon*) [J]. *Ethol Ecol Evol,* **8**(3): 265-278.

Fox EJS. 2008. A new perspective on acoustic individual recognition in animals with limited call sharing or changing repertoires [J]. *Anim Behav,* **75**(3): 1187-1194.

Gilbert G, McGregor PK, Tyler G. 1994. Vocal individuality as a census tool: practical considerations illustrated by a study of 2 rare species [J]. *J Field Ornithol,* **65**(3): 335-348.

Gill FB. 2007. Ornithology. [M].3rd ed. New York: W. H. Freeman and Company.

Hartwig S. 2005. Individual acoustic identification as a non-invasive conservation tool: an approach to the conservation of the African wild dog *Lycaon pictus* (Temminck, 1820) [J]. *Bioacoustics,* **15**(1): 35-50.

Irwin DE. 2000. Song variation in an avian ring species [J]. *Evolution,* **54**(3): 998-1010.

Kirschel ANG, Cody ML, Harlow ZT, Promponas VJ, Vallejo EE, Taylor CE. 2011. Territorial dynamics of Mexican ant-thrushes *Formicarius moniliger* revealed by individual recognition of their songs [J]. *Ibis,* **153**(2): 255-268.

Kroodsma DE. Byers BE. 1991. The function(s) of bird song [J]. *Integr Comp Biol*, **31**(2): 318-328.

Laiolo P, Vöegeli M, Serrano D, Tella JL. 2007. Testing acoustic versus physical marking: two complementary methods for individual-based monitoring of elusive species [J]. *J Avian Biol,* **38**(6): 672-681.

Lindholm A, Lindén A. 2007. Some notes on the distribution and songs of two Oriental Cuckoo taxa, *Cuculus (saturatus) saturatus* and *Cuculus (saturatus) optatus* [J]. *Forktail*, **23**(1): 12-16.

Marier PR. Slabbekoorn H. 2004. Nature's Music: The Science of Birdsong [M]. Oxford: Elsevier Academic Press.

Park SR. Park D. 2000. Song type for intrasexual interaction in the bush warbler [J]. *Auk,* **117**(1): 228-232.

Qin X, Wang YX, He T, Wei CT, Xia CW. 2011. Song characteristics of chestnut-lined rock bunting (*Emberiza godlewskii*)[J]. *J Beijing Normal Univ (Nat Sci Ed),* **47**(4): 405-408.[覃歆, 王乙霞, 何田, 魏晨韬, 夏灿玮. 2011. 灰眉岩鹀 (*Emberiza godlewskii*) 的鸣唱特征分析. 北京师范大学学报：自然科学版, **47**(4): 405-408.]

Qu WH, Li F, Sha JB, Zhang YM. 2011. Analyzing Japanese marsh warbler (*Megalurus pryeri*) song behavior in the breeding season [J]. *Zool Res,* **32**(2): 141-149.[曲文慧, 李枫, 沙剑斌, 张玉铭. 2011. 斑背大尾莺繁殖期鸣声行为分析. 动物学研究, **32**(2): 141-149]

Rognan CB, Szewczak JM, Morrison ML. 2009. Vocal Individuality of great gray owls in the Sierra Nevada [J]. *J Wildlife Manage,* **73**(5): 755-760.

Sharp SP, McGowan A, Wood MJ, Hatchwell BJ. 2005. Learned kin recognition cues in a social bird [J]. *Nature,* **434**(7037): 1127-1130.

Soma M, Zsolt Garamszegi LZ. 2011. Rethinking birdsong evolution: meta-analysis of the relationship between song complexity and reproductive success [J]. *Behav Ecol,* **22**(2): 363-371.

Terry AMR, Peake TM, McGregor PK. 2005. The role of vocal individuality in conservation[J]. *Front Zool,* **2**(1): 10.

Wegrzyn E, Leniowski K, Osiejuk TS. 2009. Introduce yourself at the beginning-possible identification function of the initial part of the song in the Great Reed Warbler *Acrocephalus arundinaceus* [J]. *Ornis Fennica,* **86**(2): 61-70.

Wang AZ, Lei FM, Jia ZY. 2003. Female choice and evolution of male songs in birds[J]. *Zool Res,* **24**(4): 305-310.[王爱真, 雷富民, 贾志云. 2003. 雌性选择与雄鸟鸣唱的进化. 动物学研究, **24**(4): 305-310.]

Wei M, Lloyd H, Zhang YY. 2011. Neighbour-stranger discrimination by yellow-bellied tit *Parus venustulus*: evidence for the "dear-enemy" effect [J]. *J Ornithol,* **152**(2): 431-438.

Wu ZK. 1986. The Avifauna of Guizhou [M]. Guiyang: Guizhou People's Publishing House.[吴至康. 1986. 贵州鸟类志. 贵阳：贵州人民出版社.]

Xia CW. 2010. Song Structure and Variation in the Song of *Cettia fortipes* [D]. Thesis, Beijing Normal University, Beijing. [夏灿玮. 2010. 强脚树莺 (*Cettia fortipes*) 鸣唱的研究. 硕士学位论文, 北京师范大学, 北京.]

Xia CW, Huang R, Wei CC, Nie PW, Zhang YY. 2011a. Individual identification on the basis of the songs of the Asian Stubtail (*Urosphena squameiceps*) [J]. *Chn Birds,* **2**(3): 132-139.

Xia CW, Wang YX, Qin X, He T, Zhang YY. 2011b. Spatial pattern of song sharing within *Emberiza godlewskii* population [J]. *Chn J Ecol,* **30**(6): 1131-1136.[夏灿玮, 王乙霞, 覃歆, 何田, 张雁云. 2011b. 灰眉岩鹀种群内鸣声的空间格局. 生态学杂志, **30**(6): 1131-1136.]

Xia CW, Xiao H, Zhang YY. 2010. Individual variation in brownish-flanked bush warbler songs[J]. *Condor,* **112**(3): 591-595.

Xiao H, Zhou ZX, Wang N, Zhang YY. 2008. Analyzing song characteristics of yellow-bellied tits (*Parus venustulus*) [J]. *Zool Res,* **29**(3): 277-284.[肖华, 周智鑫, 王宁, 张雁云. 2008. 黄腹山雀的鸣唱特征分析. 动物学研究, **29**(3): 277-284.]

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 255−260 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03255

长江口水域鱼卵、仔稚鱼种类组成和数量的分布与变化

张 衡[1,2,*], 杨胜龙[1], 孟海星[2]

（1. 中国水产科学研究院东海水产研究所 渔业资源遥感信息技术重点开放实验室, 上海 200090;
2. 华东师范大学 河口海岸学国家重点实验室, 上海 200062）

摘要：根据 2005 年 4 和 11 月、2006 年 4 和 9 月在长江河口水域进行的鱼卵、仔稚鱼种类和数量调查, 并结合 1990 年 9 月和 1991 年 3 月的历史数据, 对该水域的鱼卵、仔稚鱼群落结构的种类组成和数量的季节变化作了研究，其结果共发现鱼卵、仔稚鱼 36 种(类), 以海洋鱼类种类最多。秋季航次鱼卵、仔稚鱼的平均种类数和丰度均高于春季。河口咸淡水区鱼卵总数显著高于淡水区, 而仔稚鱼总数略低于淡水区。与 1990—1991 年数据相比, 2005—2006 年春、秋季的鱼卵和仔稚鱼丰度均有所增加。1990、2006 年秋季(9 月)鱼卵、仔稚鱼种类组成差异较大, 特别是翘嘴红鲌和太湖新银鱼丰度差异较大。这些都说明近 20 年来, 长江河口水域鱼卵、仔稚鱼种类组成和数量均发生了明显的改变。

关键词：长江河口; 鱼卵; 仔稚鱼; 种类; 年际变化
中图分类号：Q178; S931.5 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0255-06

Distribution and changes in species composition and abundance of ichthyoplankton in the Yangtze estuary

ZHANG Heng[1,2,*], YANG Sheng-Long[1], MENG Hai-Xing[2]

(1. *Key Laboratory of Fisheries Resources Remote Sensing and Information Technology Resources*, *East China Sea Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Shanghai* 200090, *China*; 2. *State Key Laboratory of Estuarine and Coastal Research*, *East China Normal University*, *Shanghai* 200062)

Abstract: Based on four surveys of eggs and larvae in the Yangtze estuary in 2005 (April and November) and 2006 (April and September), combined with the historical data of the wetland in 1990 (September) and 1991 (March), we analyzed seasonal changes in fish species composition and quantity of ichthyoplankton. Thirty-six species of egg and larvae were collected and marine fish species were the highest represented ecological guild. Average fish species and average abundance in spring were lower than in autumn for every survey. The total number of eggs in brackish water was higher than in fresh water, but the total number of larvae and juveniles in brackish water was lower. The abundance of eggs and larvae during from 2005 to 2006 in both spring and autumn was higher compared to those from 1990 to 1991. Obvious differences in species composition in September between 1990 and 2006 were found, especially for *Erythroculter ilishaeformis* and *Neosalanx taihuensis*. Fish species composition and quantity within the ichthyoplankton community has obviously changed in the Yangtze estuary over the last 20 years.

Key words: Yangtze estuary; Egg ; Larvae; Species composition; Annual change

河口区域由于上游带来的大量营养盐, 在此沉积或悬浮于水体之中, 进而孕育了大量浮游生物, 以致初、次级生产力很高, 成为海洋中的高生产区(Barnes, 1974; Berasategui et al, 2004)。由于适合仔稚鱼摄食的饵料生物非常丰富, 加上水浅及浊度高所造成的良好隐蔽性, 使得大部分的捕食者不敢靠近或难以进行捕食, 所以仔稚鱼在河口水域得以快速成长且死亡率较低(Deegan, 1990)，因此, 一些海洋性鱼类、河口定居种和淡水鱼类等大都以河口水域作为主要的产卵场和育幼场, 早期生活史主要在

收稿日期：2011-10-26；接受日期：2012-01-12
基金项目：国家“863”计划项目(2007AA092202); 国家自然科学基金项目(31170508); 大洋生物资源开发和利用上海市高校重点实验室开放基金(KF200908)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: zheng615@sina.com.cn

河口水域度过(Bell et al, 1984; Haedrich & Haedrich 1974; McErlean et al, 1973), 鱼卵、仔稚鱼的种类和数量都非常的丰富(Loneragan et al, 1989; McErlean et al, 1973)。

长江河口水域丰富的营养物质为多种经济鱼类的产卵提供条件, 成为多种仔、稚、幼鱼索饵育肥的场所(Chen & Chen, 1999; Huang, 1988; Shi, 1993; Xu et al, 1999; Yang et al, 1990)。近 50 年来, 由于受到人类活动(水域污染、大型水利工程、围垦等)的影响, 长江口生态环境破坏严重, 影响鱼类种群的正常繁殖和生长, 例如刀鲚、凤鲚、前颌间银鱼等资源量均存在不同程度的下降(Chen et al, 1999; Shi & Wang, 2002; Zhuang et al, 2006)。以往研究针对长江口及邻近海区的鱼卵、仔稚鱼群落研究较多(Jiang et al, 2006; Jiang & Shen, 2006; Luo et al, 1994; Yang et al, 1990; Zhu et al, 2002), 而涉及河口口内区域的报道很少(Xu et al, 1999)。作者利用 2005 和 2006 年春、秋季在长江口水域进行的鱼卵、仔稚鱼调查资料, 并结合 20 世纪 90 年代初, 在该水域调查的历史资料, 对其种类组成、数量特征的季节和年际变化进行分析研究, 为河口和近海渔业的可持续发展及海洋生物资源的科学保护和合理利用提供参考依据和基础资料。

1 材料与方法

租用沪南渔 4110 号船只于 2005 年 4 月中旬和 11 月上旬、2006 年 4 上旬和 9 月下旬按照《海洋调查规范》(GB12763.1-7-91) 对长江河口水域(E121°00′～122°10′; N31°00′～31°50′)进行了 4 个航次的表层拖网取样调查, 每个航次的站位一致, 每站点在潮水涨憩时取样 3 次, 取平均值作为该站位的丰度(个/网)(图 1)。拖网时间为 10 min, 船速一般保持在 2.5～3 节。其中, 2005 年的航次同时也进行了垂直拖网的取样, 在平潮时由底层至表层缓慢拖曳 1 min 左右, 取样 3 次, 取平均值作为该站位的丰度(个/网); 2005 年 11 月上旬航次因故未调查 S8 和 S9 站点。同时, 结合 1990 年 9 月上旬和 1991 年 3 月下旬进行的上海市海岛资源调查中相同站位(采样方法也相同)的历史数据进行对比分析。

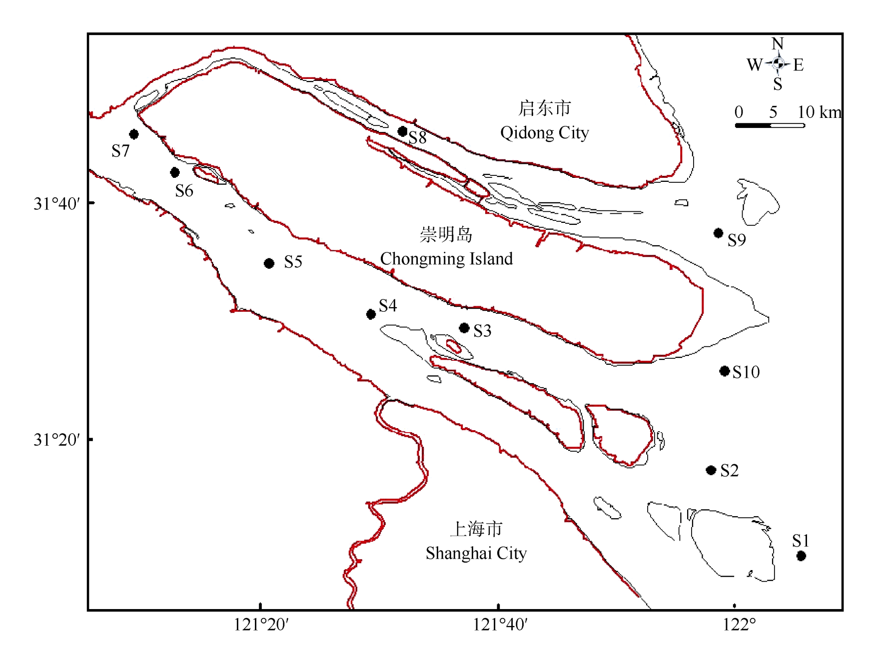


图 1 长江河口水域鱼卵、仔稚鱼调查站位示意图(S1～S10 为调查站位点)
Fig. 1 Survey stations for eggs and larvae in the Yangtze estuary (S1~S10 stations)

采样网具为大型浮游生物网, 网长 2.8 m, 网口直径 0.8 m, 网口面积 0.5 m^2, 筛绢规格 JP12(筛孔宽 0.507 mm)。各个站位的水深为 3～8 m。S3～S7 站点位于河口淡水区, 实测盐度低于 2‰; 其他站点为河口咸淡水区, 盐度为 5‰～18‰。

所采集的样品立即用 5%福尔马林溶液固定, 带回实验室进行种类鉴定、计数和发育阶段的判别。根据鱼类生活方式划分为 5 种生态类群(Elliott & Dewailly, 1995)。

2 结　果

2.1 种类组成、生态类群和优势种

六个航次调查共采集到鱼卵、仔稚鱼 36 种(类), 其中鉴定到种共计 27 种, 5 种标本鉴定到属, 3 种标本鉴定到科, 1 种标本未定种(表 1)。春季平均种类数低于秋季, 分别为 6.0 和 9.3(种/网次)。其中, 1990 年 9 月和 1991 年 3 月采集的种(类)数分别为 12 和 1 种; 2005 年 4 月和 11 月为 12 和 3 种; 2006 年 4 月和 9 月为 6 和 12 种(类)。

采集到仔鱼的种类有 30 种, 鱼卵种类有 9 种, 而采集到稚鱼的种类数很低。生态类群以海洋鱼类种类最多, 有 13 种, 占总种类数的 36.1%, 主要分

表 1　1990、1991、2005 和 2006 年长江口水域鱼卵、仔稚鱼的种类、数量百分比(%)和生态类型

Tab. 1　Species, percent and ecological guilds of eggs and larvae in 1990, 1991, 2005 and 2006 in the Yangtze estuary

种类 Species	出现时间 Time						发育阶段 Developmental stages	生态类型 Ecological guilds
	1990-09	1991-03	2005-04	2005-11	2006-04	2006-09		
寿南小沙丁鱼 *Sardinella zunasi*	0.1						L	C
小沙丁鱼属 sp. *Sardinella* sp.						3.9	L	C
鳓鱼 *Ilisha elongata*			1.9				EG	C
鳀 *Engraulis japonicus*						0.1	L	C
中颌棱鳀 *Thrissa mystax*			0.9				EG	C
凤鲚 *Coilia mystus*	37.1					0.8	L/J	C
中华小公鱼 *Stolephorus chinensis*						4.2	L	C
小公鱼属 sp. *Stolephorus* sp.	22.5					2.5	EG/L	C
太湖新银鱼 *Neosalanx taihuensis*			1.9	94.6	24.7	19.0	L	B
有明银鱼 *Salanx ariakensis*				4.7			L	C
前颌间银鱼 *Hemisalanx prognathus*			2.8		67.9		L	D
日本鳗鲡 *Anguilla japonica*					0.1		L/J	E
寡鳞飘鱼 *Pseudolaubuca engraulis*						0.5	L/J	A
麦穗鱼 *Pseudorasbora parva*			69.8		0.1		L	A
翘嘴红鲌 *Erythroculter ilishaeformis*	10.3						L	A
鲤科 sp. Cyprinidae sp.						0.1	L	A
黄颡鱼 *Pelteobagrus fulvidraco*	0.1						L	A
食蚊鱼 *Gambusia affinis*			0.9				L	A
鲻 *Mugil cephalus*			0.9				EG	B
白姑鱼 *Argyrosomus argentatus*						1.7	L	C
叫姑鱼 *Johnius belengeri*					3.6		L	C
棘头梅童鱼 *Collichthys lucidus*	2.6						L	B
鲷科 sp. Sparidae sp.						66.6	EG/L	C
细鳞鯻 *Therapon jarbua*		100					L	C
短鳄齿鱼 *Champsodon snyderi*			5.7				EG	C
纹缟虾虎鱼 *Tridentiger trigonocephalus*						0.8	L	B
虾虎鱼科 sp. Gobiidae sp.	17.7		2.5	0.7	3.6		L	B
栉孔虾虎鱼属 sp. *Ctenotrypanchen* sp.	0.1						L	B
乌鳢 *Channa arga*	0.1						L	A
蓝点马鲛 *Scomberomorus koreanus*			1.9				EG	C
圆尾斗鱼 *Macropodus chinensis*	0.1						L	A
条鳎属 sp. *Zebrias* sp.			0.9				EG	C
宽体舌鳎 *Cynoglossus robustus*						0.1	L	C
窄体舌鳎 *Cynoglossus semilaevis*	0.7						EG/L	B
舌鳎属 sp. *Cynoglossus* sp.			15.1				L	
未定种 1 种 unidentified	8.4						L	

生态类群: A, 淡水鱼类; B, 咸淡水鱼类; C, 海洋鱼类; D, 溯河洄游鱼类; E, 降海洄游鱼类. 发育阶段: EG, 鱼卵; L, 仔鱼; J, 稚鱼。

Ecological guilds: A, Fresh water fish; B, Brackish fish; C, Marine fish; D, Anadromous fish; E, Catadromous fish. Developmental stages: EG, Eggs; L, Larvae; J, Juvenile.

布在口门区(S1、S2、S9 和 S10 站点); 其次为淡水鱼类, 共 8 种, 占总种数的 22.2%, 主要有翘嘴红鲌(*Erythroculter ilishaeformis*)、麦穗鱼(*Pseudorasbora parva*)、寡鳞飘鱼(*Pseudolaubuca engraulis*)等, 主要分布在长江口南支水域(S3～S7 等站点); 咸淡水鱼类和过河口性鱼类分别为 7 和 3 种, 占 19.4%和 7.1%, 主要有太湖新银鱼(*Neosalanx taihuensis*)、凤鲚(*Coilia mystus*)、前颌间银鱼(*Hemisalanx prognathus*)等。

以占各站总数量的比例>20%的种类定义为优势种, 1990 年 9 月凤鲚为绝对优势种, 数量百分比为 37.1%; 其次为小公鱼属 sp., 数量百分比为 22.5%。2005 年 4 月麦穗鱼为优势种, 数量百分比为 69.8%; 11 月太湖新银鱼为优势种, 数量百分比为 94.6%, 在各个站位的出现频次也较高。2006 年 4 月前, 颌间银鱼为优势种, 数量百分比为 67.9%; 9 月优势种为鲷科鱼类和太湖新银鱼(表 1)。

2.2 数量分布

6 次调查共发现鱼卵 727 粒, 仔稚鱼 852 尾, 其中垂直网采集到鱼卵 12 粒和仔稚鱼 78 尾。1990 一 1991 年春秋季在表层拖网中共发现鱼卵 2 粒, 仔稚鱼 215 尾; 2005 年春秋季共发现鱼卵 11 粒, 仔稚鱼 271 尾; 2006 年发现鱼卵 702 粒, 仔稚鱼 288 尾。春季调查的 3 个航次所捕获的鱼卵、仔稚鱼总个体数均低于秋季 3 个航次, 分别是 4、43、11 和 731、296、979 个。在前 4 个航次里, 垂直网和表层拖网采集到的鱼卵总数相差不大, 而仔稚鱼数量前者仅为后者的 8%, 且前者采集到的种类数均低于后者(表 2)。一般来说, 不论表层拖网还是垂直拖网, 均是鱼卵数低于仔稚鱼数, 但 2006 年 9 月采集的鱼卵数高于仔稚鱼数, 约是后者的 2.5 倍。

表 2 不同调查航次所捕获的鱼卵和仔稚鱼的总个体数和种类数

Tab. 2 Total number of individuals and species of egg, larvae and juvenile in different surveys

时间 Time	垂直拖网 Vertical trawl		种类数 Number of Species	表层拖网 Horizontal trawl		种类数 Number of Species
	鱼卵 Egg	仔稚鱼 Larvae and juvenile		鱼卵 Egg	仔稚鱼 Larvae and juvenile	
1990.09	10	24	7	2	212	12
1991.03	0	0	0	0	3	1
2005.04	2	0	2	11	29	12
2005.11	0	54	2	0	242	3
2006.04	—	—	—	0	11	6
2006.09	—	—	—	702	277	12

根据表层拖网的丰度数据进行鱼卵和仔稚鱼的平均丰度分布差异分析。各个航次的鱼卵出现的站位数均显著低于仔稚鱼(ANOVA, $P<0.01$)(图 2)。鱼卵丰度最高值的出现在 S9 站点, 2006 年 9 月高达 700 个/网(图 2f), 绝大多数为鲷科鱼类鱼卵, 少数为小公鱼属鱼卵; 仔稚鱼丰度最高值出现在 S3 站点, 2005 年 11 月达 179 个/网(图 2d), 主要为太湖新银鱼仔鱼。总体来讲,6 个航次中 S9 站点采集的鱼卵和仔稚鱼平均丰度最高, 为 138.8 个/网/航次; 其次为 S3 站点, 为 40.5 个/网/航次, 其它站点一般为 4.3～15.2 个/网/航次。6 个航次中, 河口咸淡水的 5 个站点(S1、S2、S8、S9 和 S10)的鱼卵和仔稚鱼总数分别为 715 粒和 357 尾, 而南支淡水区 5 个站点(S3～S7)为 0 粒和 495 尾。与 1990—1991 年数据相比, 2005—2006 年春、秋季的鱼卵和仔稚鱼的平均丰度均有所增加(图 2)。

3 讨 论

本研究的六次调查虽未在 5—8 月鱼卵、仔稚鱼补充高峰期进行, 但调查到的种类达到了 36 种(类), 略高于世界上同纬度地区其它河口或泻湖, 如南非的 East Kleinemond 泻湖(33°S, 33 种)(Cowley & Whitfield, 2001), 澳大利亚的 Nornalup-Walpole 泻湖(S35°, 31 种)(Potter & Hyndes, 1994)和 RÍo de la Plata 河口(S35°, 35 种)(Lasta, 1995; Macchi et al, 2002), 说明长江河口鱼卵、仔稚鱼的物种多样性较高, 是河口及邻近海洋渔业资源的重要补充来源之一。

Yang et al(1990)对长江口及邻近海域鱼卵、仔稚鱼进行了周年调查发现, 春季 3—4 月上旬鱼卵和仔稚鱼数量较低, 略低于秋季, 这与本研究结果类似。本研究发现春季航次鱼卵、仔稚鱼的总个体数均低于秋季航次(表 2), 说明春季(3—4 月初)产卵

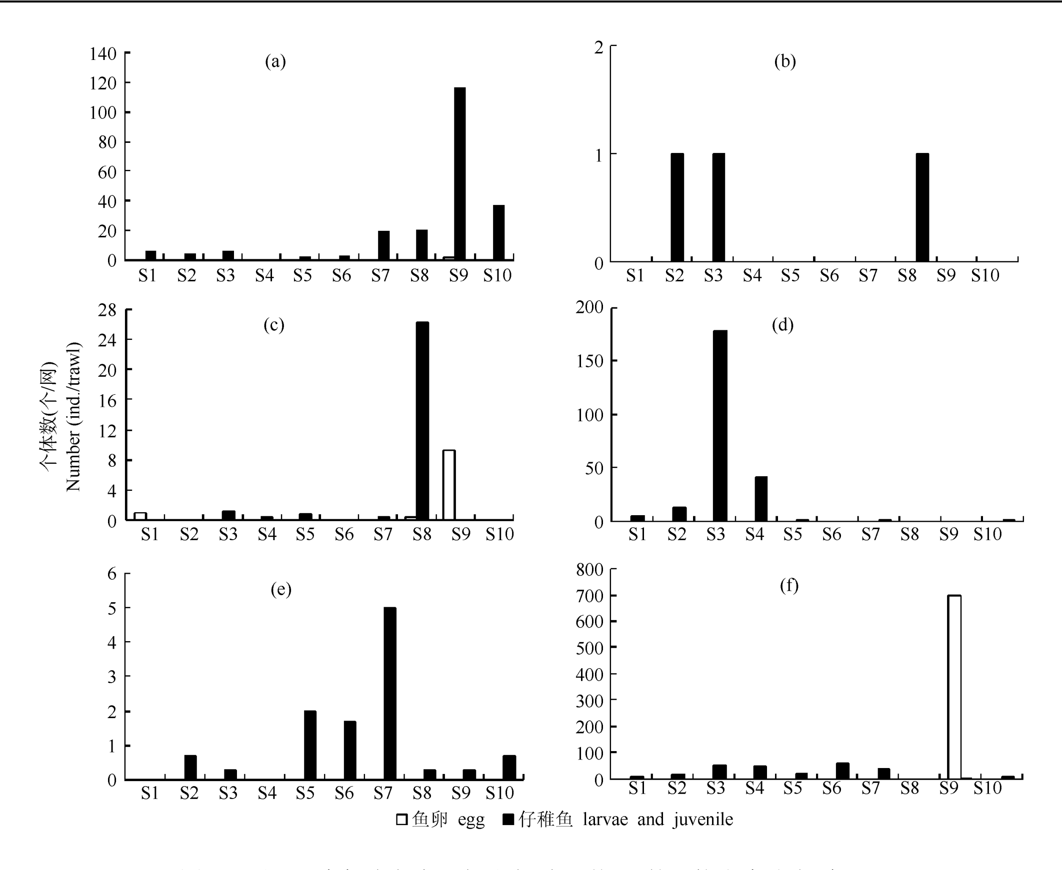


图 2　不同调查航次鱼卵、仔稚鱼(表层拖网)的平均丰度分布(个/网)

Fig. 2　Distribution of average abundance of eggs, larvae and juveniles for different surveys (ind./trawl)

(a): 1990-09; (b)1991.03; (c): 2005-04; (d): 2005-11; (e): 2006-04; (f): 2006-09.

的鱼类种类较少。大量研究表明，口内淡水区鱼卵数量分布很少，而口门咸淡水区及邻近海域分布较多(Xu et al, 1999; Yang et al, 1990; Zhu et al, 2002)。本研究的 6 次调查均未在河口淡水区(S3～S7 站点)采集到鱼卵，而在河口咸淡水区(S1 和 S9 站点)则采集到较多鱼卵，主要因淡水鱼类多产黏性和沉性卵，而口门区许多海洋鱼类产漂浮性卵(Zhuang et al, 2006)，有利于大型浮游生物网捕获。

长江口鱼卵、仔稚鱼群落的另一特点是淡水鱼类种类较多，约占总种数的三分之一，而邻近海域则以海洋鱼类种类最多，淡水鱼类比例很少(Jiang et al, 2006; Jiang & Shen, 2006; Yang et al, 1990; Zhu et al, 2002)，这也反映了长江口鱼卵、仔稚鱼群落组成具有一定的特殊性。

许多研究表明，近 20 年来，由于受到过度捕捞、水域环境污染等人为因素影响，长江河口鱼类资源衰退严重，各种鱼类的补充群体资源量下降迅速，这必将导致鱼卵、仔稚鱼种类组成发生较大变化(Xu et al, 1999; Zhuang et al, 2006)。本研究发现 1990 和 2006 年 9 月航次的种类组成差异较大，如 1990 年翘嘴红鲌数量和出现频次均较高，而 2006 年没有发现翘嘴红鲌，优势种为太湖新银鱼，而小公鱼属的丰度差异相对较小(表 1)。另外, 2006 年调查的凤鲚的仔稚鱼平均丰度仅约是 1990 年的 1/10，说明近十几年来凤鲚的补充群体资源已明显下降，在一定程度上解释了凤鲚成鱼资源有所下降的原因。前颌间银鱼的补充群体更是严重下降，Xu et al(1999)于 1997 年 5 月在长兴岛南侧未发现前颌间银鱼的仔稚鱼，本研究调查到的丰度也很低，仅为 1.3 个/网，低于 1986 年同期的 14.5 个/网(Huang et al, 1992)，说明该种群的补充群体已降到很低的水平，造成其成鱼资源在近 20 年来一直处于很低的水平，主要原因有亲体的过度捕捞和产卵场水域的严重污染等(Xu et al, 1999; Ni et al, 1990)。

综上所述，长江河口鱼卵、仔鱼群落组成已发生了较大变化，主要是部分经济鱼类的补充群体下降较为严重，但由于相关研究报道得很少，进一步深入研究和相关保护工作急需加强。

致谢：本次调查得到崇西湿地科学实验站和华东师范大学河口海岸学重点实验室同仁的大力帮助； 种类鉴定得到了东海水产研究所陈莲芳研究员、黄海水产研究所万瑞景研究员和上海海洋大学钟俊生教授的鼎力相助，谨致谢忱！

参考文献：

Barnes RSK. 1974. Estuarine Biology[M]. London: Edward Arnold.

Bell JD, Pollard DA, Burchmore JJ, Pease BC, Middleton MJ. 1984. Structure of a fish community in a temperate tidal mangrove creek in Botany Bay, New South Wales[J]. *Aust J Mar Freshw Res,* **35**(1): 33-46.

Berasategui AD, Acha EM, Fernández Araoz NC. 2004. Spatial patterns of ichthyoplankton assemblages in the Río de la Plata Estuary (Argentina-Uruguay)[J]. *Est Coast Shelf Sci,* **60**(4): 599-610.

Chen YQ, Chen YQ. 1999. The new and sustainable utilization pattern on the fishery resources in the Yangtze estuary[J]. *J Fish Sci Chn,* **6**(5): 72-74. [陈亚瞿, 陈渊泉. 1999. 长江河口区渔业资源利用新模式及可持续利用的探讨[J]. 中国水产科学, **6**(5): 72-74.]

Chen YQ, Jiang M, Han JD. 1999. A study on the temporal and spatial distributional features of juvenil Anguilla japonica and utilizing status of the resource in the Changjiang estuary[J]. *J Fish Sci Chn,* **5**(S1): 37-40. [陈渊泉, 蒋玫, 韩金娣. 1999. 长江口鳗苗时空分布特征及资源利用现状研究[J]. 中国水产科学, **5**(S1): 37-40.]

Cowley PD, Whitfield AK. 2001. Ichthyofaunal characteristics of a typical temporarily open/closed estuary on the Southeast coast of South Africa[J]. *Ichthyol Bull*. (71):1-17.

Deegan LA. 1990. Effects of estuarine environmental conditions on population dynamics of young-of-the-year gulf menhaden[J]. *Mar Ecol Prog Ser,* **68**(1-2): 195-205.

Elliott M, Dewailly F. 1995. The structure and components of European estuarine fish assemblages[J]. *Nether J Aquatic Ecol,* **29**(3-4): 397-417.

Haedrich RL, Haedrich SO. 1974. A seasonal survey of the fishes in the mystic river, a polluted estuary in downtown Boston, Massachusetts[J]. *Estuar Cstl Mar Sci,* **2**(1): 59-73.

Huang JB. 1988. Study on the relationship on quantity between eggs and larvae or juveniles in the Yangtze River estuary[J]. *Fish Sci Technol Inform,* (1): 20-21. [黄晋彪. 1988. 长江河口区鱼卵和仔、稚鱼种间数量关系的研究[J]. 水产科技情报, (1): 20-21.]

Jiang M, Shen XQ. 2006. Abundance distributions of pelagic fish eggs and larva in the Changjiang River estuary and vicinity waters in summer[J]. *Mar Sci,* **30**(6): 92-97. [蒋玫, 沈新强. 2006. 长江口及邻近水域夏季鱼卵、仔鱼数量分布特征[J]. 海洋科学, **30**(6): 92-97.]

Jiang M, Shen XQ, Chen LF. 2006. Relationship between with abundance distribution of fish eggs,larvae and environmental factors in the Changjiang Estuary and vicinity waters in spring[J].*Mar Envuron Sci,,* **25**(2): 37-44. [蒋玫, 沈新强, 陈莲芳. 2006. 长江口及邻近水域春季鱼卵仔鱼分布与环境因子的关系[J]. 海洋环境科学, **25**(2): 37-44.]

Lasta CA. 1995. La Bahía Samborombón: Zona De Desove Y Cría De Peces[D]. Ph.D. dissertation, Facultad de Ciencias Naturales y Museo, Universidad Nacional de la Plata, La Plata.

Loneragan NR, Potter IC, Lenanton RCJ. 1989. Influence of site, season and year on contributions made by marine, estuarine, diadromous and freshwater species to the fish fauna of a temperate Australian estuary[J]. *Mar Biol*, **103**(4): 461-479.

Macchi GJ, Acha EM, Lasta CA. 2002. Reproduction of black drum (*Pogonias cromis*) in the Río de la Plata estuary, Argentina[J]. *Fish Res,* 59(1-2): 83-92.

McErlean AJ, O'Connor SG, Mihursky JA, Gibson CI. 1973. Abundance, diversity and seasonal patterns of estuarine fish populations[J]. *Estuar Cstl Mar Sci,* **1**(1): 19-36.

Ni Y, Wang YH, Xu CY, Xiong GQ. 1990. The Fishes of Shanghai Area[M]. Shanghai: Science and Technology Press in Shanghai. [倪勇, 王幼槐, 许成玉, 熊国强. 1990. 上海鱼类志[M]. 上海: 上海科学技术出版社.]

Potter IC, Hyndes GA. 1994. Composition of the fish fauna of a permanently open estuary on the southern coast of Australia, and comparisons with a nearby seasonally closed estuary[J]. *Mar Biol,* **121**(2): 199-209.

Shi DL. 1993. Utilization and management on Japanese eel of Chongming Island of Yangtze estuary[J]. *J Mar Fish Chn,* (6): 264-266. [施德龙. 1993. 崇明对长江鳗苗资源的利用及管理[J]. 海洋渔业, (6): 264-266.]

Shi WG, Wang B. 2002. Status quo of tapertail anchovy resource in the estuaries of the Yangtze River[J]. *Acta Hydrobiol Sin,* **26**(6): 648-653. [施炜纲, 王博. 2002. 长江河口区凤鲚的资源现状[J]. 水生生物学报, **26**(6): 648-653.]

Xu ZL, Yuan Q, Jiang M, Zang ZJ. 1999. An investigation of fish eggs, larvae and juveniles in the Changjiang esturary[J]. *J Fish Sci Chn,* **6**(5): 63-64. [徐兆礼, 袁骐, 蒋玫, 藏增加. 1999. 长江口鱼卵和仔、稚鱼的初步调查[J]. 中国水产科学, **6**(5): 63-64.]

Yang DL, Wu GZ, Sun JR. 1990. The investigation of pelagic eggs, larvae and juveniles of fishes at the mouth of the Changjiang River and adjacent areas[J]. *Oceanol Limnol,* **21**(4): 346-355. [杨东莱, 吴光宗, 孙继仁. 1990. 长江口及其邻近海区的浮性鱼卵和仔稚鱼的生态研究[J]. 海洋与湖沼, **21**(4): 346-355.]

Zhu XH, Liu D, Sha XK. 2002. Relationship between community structure of ichthyoplankton and environmental factors in the estuary of Changjiang river in spring[J]. *Bull Mar Sci,* **44**: 169-178. [朱鑫华, 刘栋, 沙学绅. 2002. 长江口春季鱼类浮游生物群落结构与环境因子的关系[J]. 海洋科学集刊, **44**: 169-178.]

Zhuang P, Wang YH, Li SF, Deng SM. 2006. Fishes of the Yangtze Estuary[M]. Shanghai: Science and Technology Press in Shanghai, 1-100. [庄平, 王幼槐, 李圣法, 邓思明. 2006. 长江口鱼类[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1-100.]

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 261−270 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03261

西伯利亚鲟仔鱼侧线系统的发育

宋 炜[1,2,3]，宋佳坤[1,2,*]

（1. 上海海洋大学 海洋生物系统和神经科学研究所，上海 201306; 2. 上海海洋大学 水产与生命学院，上海 201306; 3. 农业部东海与远洋渔业资源开发利用重点实验室，中国水产科学研究院 东海水产研究所，上海 200090）

摘要：鲟鱼属软骨硬鳞鱼，在电感受器的进化中占据着极为重要的地位。该文以光镜和扫描电镜手段研究了西伯利亚鲟侧线系统早期发育，包括侧线基板发育及感觉嵴的形成、侧线感受器的发育和侧线管道的形成。1 日龄，听囊前后外胚层增厚区域出现 6 对侧线基板；除后侧线基板细胞向躯干侧面迁移外，其他侧线基板均形成感觉嵴结构；每一侧线基板中均有神经丘原基形成。7 日龄，壶腹器官在吻部腹面两侧出现，壶腹器官的发育比神经丘晚一周左右。9 日龄，神经丘下的表皮略有凹陷，侧线管道开始形成。29 日龄，在吻部腹面两侧可见少数个别的壶腹器官表皮细胞覆盖壶腹器官中央区域留下 3～4 个小的开口；壶腹管内可见大量的微绒毛存在，在其他鲟形目鱼类、软骨鱼类中也存在类似的结构。57 日龄，躯干侧线管道已完全埋于侧骨板中；壶腹器官主要分布在吻部腹面，3～4 个聚集在一起，呈“梅花状”，分布紧密，并且该部分皮肤表面凹陷，形成花朵状凹穴；侧线系统发育完善。

关键词：鲟鱼；神经丘；壶腹器官；电感受器；侧线基板
中图分类号：Q959.463; Q432 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0261-10

Development of the lateral line system in juvenile Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*)

SONG Wei[1,2,3], SONG Jia-Kun[1,2,*]

(1. *Institute for Marine Biosystem and Neurosciences, Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*; 2. *College of Fishery and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;* 3. *Key Laboratory of East China Sea and Oceanic Fishery Resources Exploitation*, *Ministry of Agriculture*; *East China Sea Fisheries Research Institute*, *the Chinese Academy of Fishery Science*, *Shanghai* 200090, *China*)

Abstract: The Siberian sturgeon (*Acipenser baerii* Brandt), a chondrostean, occupies an important position in the evolution of the electroreceptor. In order to more fully understanding the evolution of these receptors, we examined the development of the lateral line system during early ontogeny of the Siberian sturgeon by using light and scanning electron microscopes. We detected four major events in this process: the lateral line placodal development, the sensory ridge formation, the receptor formation and the canal formation. On day 1 of post hatching, all six lateral line placodes are present and the posterior lateral line placode starts actively migrating posteriorly along the mid-line of the trunk, depositing neuromasts at intervals on the way of migration. The other lateral line placodes elongate to form sensory ridges according to its destination line pattern over the head, all containing primordial neuromasts. By day 7, ampullary organs rise from the lateral zones of the ventral of the head, though this may lag up to one week behind of that of the neuromasts. On day 9, the epidermis under the neuromast slowly invaginates, and the bony lateral line canals begin to form. Towards day 29, the epidermal cells surrounded some single openings of the ampullary organs at the ventral surface of the head, begin to migrate, and then transform into 3 to 4 aggregate openings. By this point, abundant microvilli are visible on the surface of the receptor epithelium, similar to the structure in elasmobranches and other sturgeons. On the day 57 of post hatching, the trunk canal is fully embedded into the lateral scutes. By then, the majority of ampullary organs are highly concentrated on the ventral rostrum, arranged in clusters of 3−4, distributing closely such as the shape of quincunx, thus completing the formation of the lateral line system.

Key words: Sturgeon; Neuromasts; Ampullary organs; Electroreceptors; Lateral line placodes

收稿日期：2012-01-16；接受日期：2012-03-24
基金项目：上海市科学技术委员会 2008 年科研计划资助项目(073205109)；公益性行业科研专项经费项目(201003055-07)
* 通信作者(Corresponding author)，教授，博士生导师, E-mail: jksong@shou.edu.cn
第一作者简介：宋炜(1983 一)，男，助理研究员，博士，研究方向：鱼类形态及发育生物学研究。E-mail: swift83@sina.com

侧线系统是皮肤衍生的感觉器官，为鱼类和水生两栖类所特有，在鱼类的摄食、御敌、生殖、洄游等行为中发挥重要作用(Baker & Bronner-Fraser, 2001; Goulet et al, 2008; Mogdans & Geisen, 2009; Wilkens & Hofmann, 2007)。它由机械感受器和电感受器组成。机械感受器能感受水流、水压的变化；电感受器能检测周边微弱电场变化(Cheng et al, 1995; Northcutt, 1992; Song et al, 1995)。不同于机械感受器，电感受器在硬骨鱼类中经历了二次进化，如部分辐鳍亚纲鱼类(多鳍鱼和鲟鳇鱼等)存在与软骨鱼类相似的壶腹型电感受器；而新鳍亚纲中的雀鳝目、弓鳍鱼目电感受器缺失，仅存在机械感受器。在部分现代真骨鱼(骨舌鱼类和个别鲶鱼等)中又出现了结节状电感受器，但电感受器的进化历程，尚未完全了解(Gibbs, 2004; O'Neill et al, 2007)。

鲟鱼是软骨硬鳞下纲中现存的唯一一目，素有“活化石”之称(Ma, 2007; Wang et al, 2009)。它是少数具有壶腹型电感受器的硬骨鱼类之一，在电感受器进化中占据极为重要的地位(Gibbs & Northcutt, 2004; Hofmann et al, 2002; Song et al, 2010)。西伯利亚鲟 (A*cipenser baerii* Brandt) 隶属鲟形目 (Acipenseriformes) 鲟科 (Acipenseridae) 鲟属 (*Acipenser*)，主要分布于俄罗斯西部的鄂毕河至东部的科雷马河之间的各河流中(Gisbert & Williot, 2002)。西伯利亚鲟头部具较为丰富的电感受器(Gibert et al, 1999)，且适应性广、生长速度快、具有抗病能力，现已成为我国淡水养殖的优良品种(Lin, 2003)。近年来，有关西伯利亚鲟的研究已有不少，在早期发育方面，对其早期行为学、眼睛发育已进行了较系统的研究(Gisbert & Ruban, 2003; Rodríguez & Gisbert, 2002)，而侧线系统发育相关研究尚未见报道。本研究从形态学和组织学角度，应用光镜和扫描电镜研究西伯利亚鲟侧线系统早期发育，不仅对研究电感受器的起源与进化有着重要意义，而且为人工育苗积累基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

西伯利亚鲟受精卵为杭州千岛湖鲟龙科技开发有限公司全人工繁殖所得子二代(F_2)卵。受精卵在实验室经人工孵化，孵化温度控制在(18±0.7) ℃。出膜后的仔鱼置于35 cm (长)×21 cm (宽)的塑料水族箱中饲养，水深保持 15 cm。实验用水需经充分曝气，用加热棒控温。开口饵料为水蚯蚓，进入稚鱼阶段后投喂颗粒饲料。实验过程中每天投喂 2 次，排污和换水各 1 次，每次换水量为水体的 1/4。

1.2 实验方法

记载鱼苗出膜高峰期当天为 0 日龄。早期仔鱼阶段每 24 h 取材 1 次；晚期仔鱼和稚鱼阶段，每 48 h 取材 1 次。每阶段取材 10 尾，立即用 3-氨基苯甲酸乙酯甲基磺酸盐(MS-222)麻醉，其中 5 尾经 Bouin 氏液固定后，按照常规组织学方法制作石蜡切片，作连续切片(厚度 5～7 μm)，H.E.染色，中性树胶封片，Olympus 显微镜下观察并拍照。另外 5 尾，经 2.5% 戊二醛和 1% 锇酸双重固定，梯度酒精脱水，醋酸异戊酯取代，临界点干燥，喷金，JEOL-6390LV 扫描电镜观察并拍照。

2 结果与分析

西伯利亚鲟侧线系统早期发育过程主要包括侧线基板发育及感觉嵴的形成、侧线感受器的发育以及侧线管道的形成。

2.1 侧线基板发育及感觉嵴的形成

1 日龄，刚出膜的仔鱼头部较小，弯向卵黄囊；嗅囊呈椭圆形，触须原基和鳃原基形成(图 1A)。在听囊前后外胚层增厚区域出现 6 对侧线基板。听囊前有 3 对分布，分别为前背侧基板、前腹侧基板、听侧线基板；听囊后的 3 对分别为中间基板、横枕基板和后侧线基板(图 1B)。侧线基板成神经细胞形成(图 2A, B)。前背侧基板、前腹侧基板、听侧线基板、中间基板、横枕基板开始延长形成过渡性结构—感觉嵴，神经丘原基在所有的感觉嵴上形成，并且在听侧线基板感觉嵴中央区域已有 3 个神经丘出现(图 2C)；后侧线基板没有形成感觉嵴结构，而是开始向躯干部迁移，在躯干部特定的位置遗留下部分细胞，这群细胞最终将发育成为神经丘(图 2D)。

5 日龄，仔鱼头部抬起并伸长，嗅囊中间内侧靠拢，呈“哑铃状”，鳃丝外露，触须增长，呈圆柱状(图 1C)。前背侧基板感觉嵴分别向眶上和眶下延伸，形成眶上感觉嵴和眶下感觉嵴。眶上感觉嵴出现 4 个神经丘；眶下感觉嵴出现 1 个神经丘。 前腹侧基板感觉嵴向背部略有延长。 听侧线基板感觉嵴和中间感觉嵴在同一直线上，听侧线基板出现 4 个神经丘，中间基板出现 1 个神经丘；横枕感觉嵴向

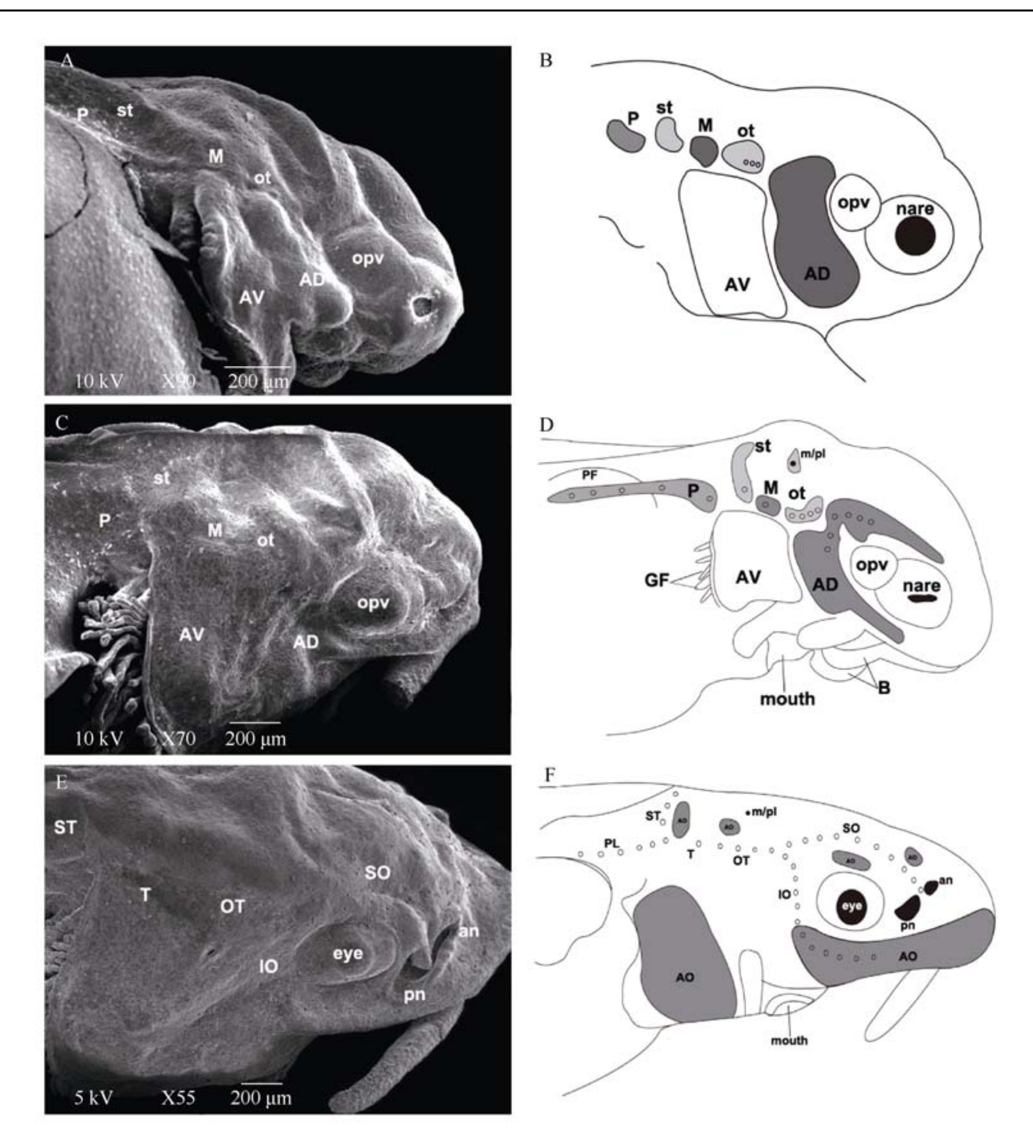


图1　西伯利亚鲟头部扫描电镜图(A, C, E)及相关侧线发育模式图(B, D, F)

Fig.1　Scanning electron micrographs of the lateral surface of the head (A,C,E) and the camera lucida drawings of the lateral view of the head (B,D,F)

A, B) 1日龄仔鱼头部侧面; C, D) 5日龄仔鱼头部侧面; E, F) 9日龄仔鱼头部侧面。AD：前背侧基板; AV：前腹侧基板; ot：听侧线基板; M：中间基板; st：横枕基板; P：后侧线基板; opv：视泡; m/pl：中间或后陷器线; B：触须; PF：胸鳍; GF：鳃丝; SO：眶上线; IO：眶下线; OT：听侧线; T：颞线; ST：横枕线; PL：后侧线; an：前鼻孔; pn：后鼻孔; AO：壶腹器官(深灰色阴影部位)。

A, B) day 1 post hatching; C, D) day 5 post hatching; E, F) day 9 post hatching. AD: anterodorsal placode; AV: anteroventral placode; ot: otic lateral line placode; M: middle placode; st: supratemporal placode; P: posterior placode; opv: optic vesicle; m/pl: middle/posterior pit lines; B: barbells; PF: pectoral fin; GF: gill filament; SO: supraorbital line; IO: infraorbital line; OT: otic lateral line; T: temporal lateral line; ST: supratemporal line; PL: posterior lateral line; an: anterior nare; pn: posterior nare; AO: ampullary organs (dark gray shaded portion).

背部的中线迁移, 出现1个神经丘; 后侧线基板已迁移至胸鳍后端, 并有5个神经丘形成; 此外, 在中间陷器线和后陷器线的位置有1个神经丘出现; 壶腹器官原基在前背侧基板中形成(图1C, D)。

9日龄, 仔鱼头部扁平, 鼻孔中间缝合, 形成前后两鼻孔, 口呈水平位(图1E), 此时仔鱼开始营底栖生活, 营养从内源向外源转换, 仔鱼各器官快速发育。眶上感觉嵴和眶下感觉嵴的后端连接处已与听侧线基板感觉嵴相连接。中间基板感觉嵴向前后轴伸长, 前端与听基板感觉嵴融合, 后端与横枕基板感觉嵴、后侧线基板融合, 此时侧线管道开始形成。神经丘在所有感觉嵴中央出现, 其中眶上管10个, 眶下管17个, 听管4个, 颞管2个, 横枕管3个。后侧线基板已迁移至尾部。壶腹器官在前背侧基板、前腹侧基板、听基板、横枕基板中出现, 并且在前背侧基板中有少数壶腹器官发育完全(图1E, F)。

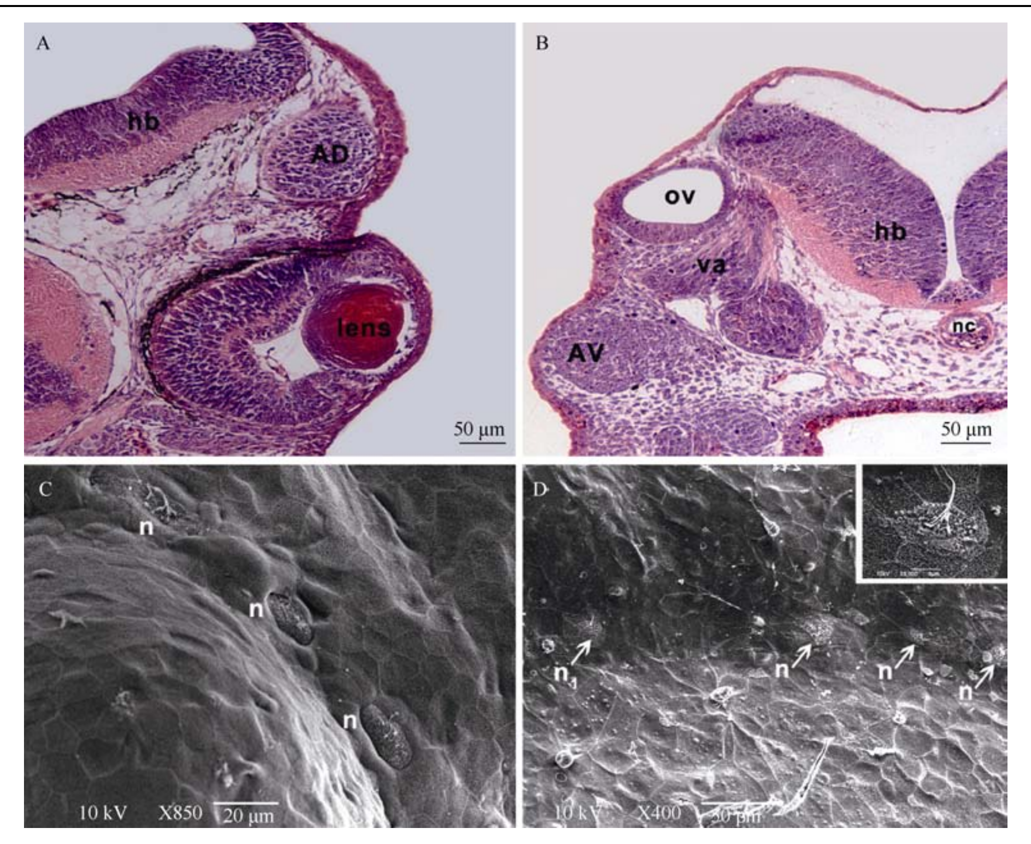


图 2 西伯利亚鲟头部横切及相关侧线发育模式图

Fig.2 Photomicrographs of transverse sections through the head and the scanning electron micrographs of erupting neuromasts located to the otic lateral line

A, B) 1 日龄西伯利亚鲟头部横切图; C) 1 日龄听侧线神经丘扫描电镜图; D) 5 日龄后侧线基板向躯干部迁移, 在躯干部特定位置遗留下部分细胞, 发育成神经丘。内插图为神经丘(n_1)放大图。AD：前背侧基板神经节; AV：前腹侧基板神经节; lens：晶状体; hb：后脑; va：听神经中枢; nc：脊索; ov：听囊; n：神经丘。

A, B) day 1 post hatching; C) scanning electron micrographs of erupting neuromasts located to the otic lateral line at day 1 post hatching; D) the posterior lateral line placode actively migrates along the trunk, depositing neuromasts at intervals.. Insert: Higher magnification of neuromast (n_1). AD: anterodorsal placode ganglion; AV: anteroventral placode ganglion; hb: hindbrain; va: vestibuloacoustic ganglion; nc: notochord; ov: otic vesicle; n: neuromast.

2.2 侧线感受器的发育

2.2.1 神经丘的发育 扫描电镜下, 0 日龄, 神经丘在听侧线基板感觉嵴中出现, 呈椭圆形, 外层为套细胞, 形成椭圆形带, 中央可见 2～3 束感觉毛细胞的纤毛延伸突出于神经丘表面(图 3A)。5 日龄, 神经丘呈椭圆形凹陷, 凹陷周围由套细胞的延伸组成, 感觉毛细胞的纤毛束数量增多, 并且延长突向表面, 因黏液的分泌使纤毛黏成多束(图 3B)。29 日龄, 神经丘表面胶质覆盖物形成, 毛细胞和支持细胞继续生长, 毛细胞和支持细胞的数量也不断增加。49 日龄, 神经丘呈长椭圆形, 长径约 47 μm, 短径约 20 μm; 神经丘中央形成由约 22 个毛细胞组成的感觉极性区域, 每一个毛细胞均有一根动纤毛和数根静纤毛, 动纤毛总是位于细胞的一侧, 静纤毛群侧位于另一侧且排列成排, 使得细胞具有极性，其周围由大量的支持细胞和套细胞组成(图 3C)。此时, 部分神经丘正被管道覆盖(图 3D)。52 日龄, 神经丘已完全被骨化的管道所包埋, 并且在侧线管内有规律地按一定距离分布。

2.2.2 壶腹器官的发育 7 日龄, 感觉上皮开始下陷, 含少量感觉细胞和支持细胞, 形状不规则, 染色较浅 (图 4A)。9 日龄, 感觉上皮下陷明显, 感觉细胞和支持细胞数量增加, 感觉细胞核染色较深(图 4B)。29 日龄, 壶腹器官在表皮开口的宽度以及下陷的深度明显增加, 感觉细胞和支持细胞数量继续增加。在吻部腹面两侧可见少数个别的壶腹器官表皮细胞覆盖壶腹器官中央区域留下 3～4 个小的开口(图 5)。36 日龄, 感觉上皮继续下陷, 感觉细胞数量较支持细胞多, 排列紧密(图 4C)。57 日龄, 大部分壶腹器官发育成熟, 呈长颈瓶状, 瓶结构内部

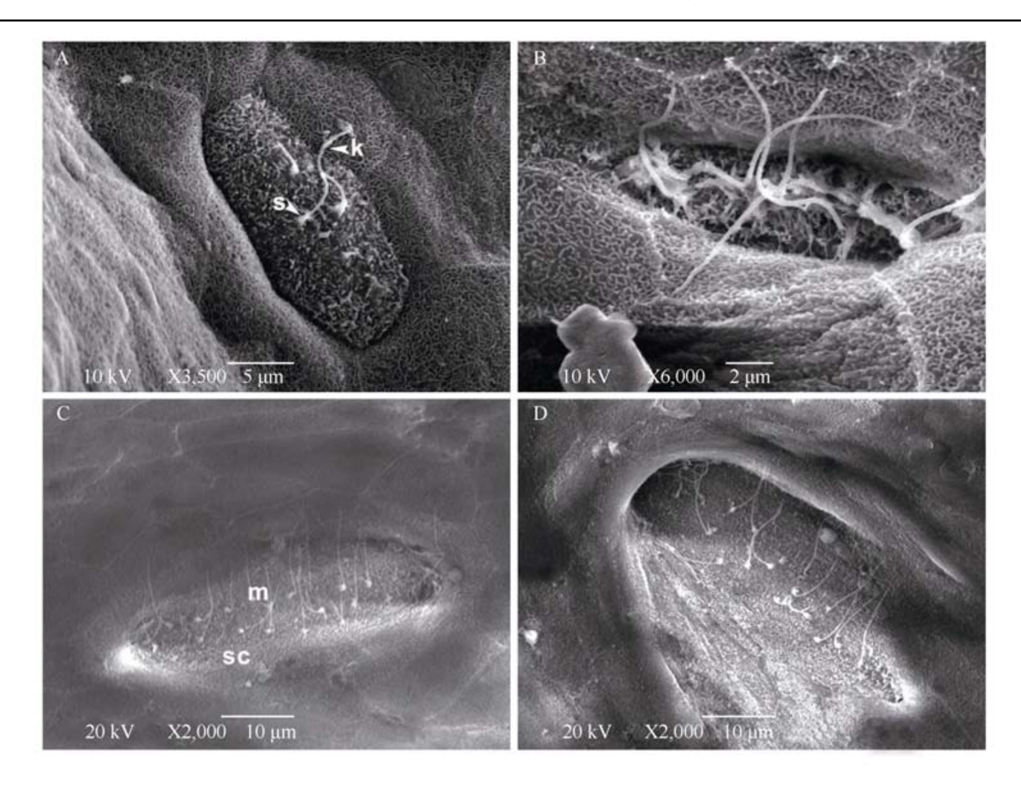


图 3　西伯利亚鲟头部神经丘发育图

Fig.3　Scanning electron micrographs of various stages in the development of neuromasts of the head

A) 0 日龄管道神经; B) 5 日龄管道神经; C, D) 49 日龄管道神经。 K：动纤毛; S：静纤毛; m：神经丘感觉极性区域; SC：支持细胞。

A) the neuromast at the hatching stage; B) the neuromast at day 5 post hatching; C, D) the neuromast at day 49 post hatching. k: kinocilium; s: stereocilia; m: sensory macula of neuromast; sc: support cells。

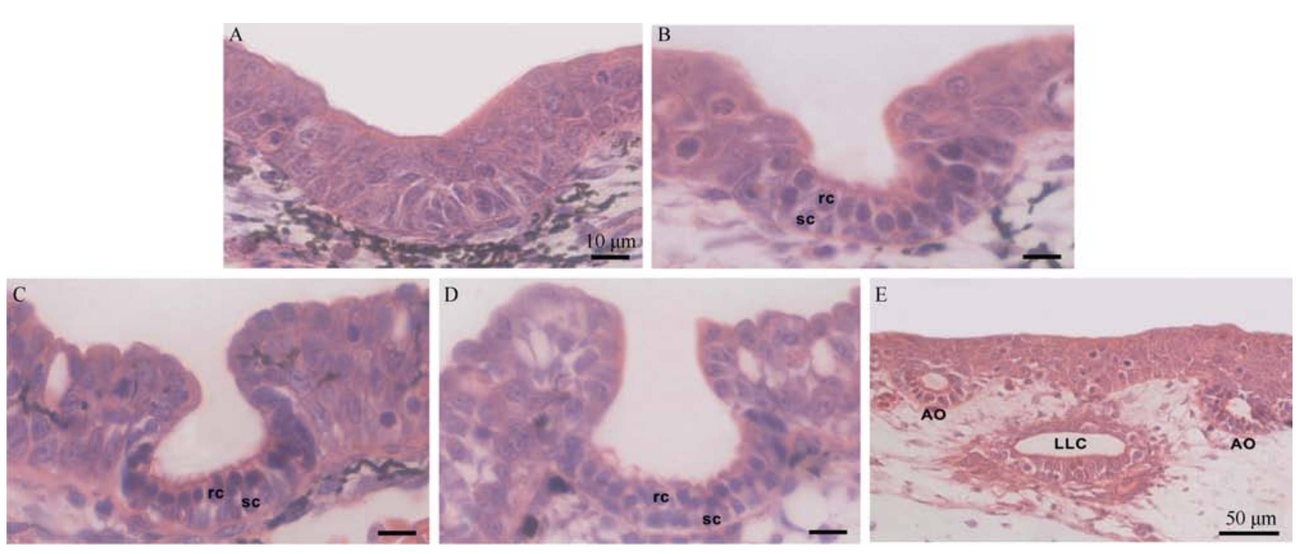


图 4　壶腹器官发育图

Fig.4　Micrographs under optical microscope of ampullary organs at different development stages

A) 7 日龄壶腹器官; B) 9 日龄壶腹器官; C) 36 日龄壶腹器官; D) 57 日龄壶腹器官; E) 57 日龄，可见大多数壶腹器官常分布在神经丘两侧。rc：感觉细胞; sc：支持细胞; AO：壶腹器官; LLC：侧线管。

A) ampullary organ at day 7 post hatching; B) ampullary organ at day 9 post hatching; C) ampullary organ at day 36 post hatching; D) ampullary organ at day 57 post hatching; E) the distribution of ampullary organs are closely associated with the neuromast lines at day 57 post hatching. rc: receptor cells; sc: support cells; AO: ampullary organ; LLC: lateral line canal.

充满黏液，瓶口开口于皮肤表皮，与外环境相接触，瓶的底部埋在真皮层内，感觉细胞和支持细胞位于瓶底内部，感觉细胞呈卵圆形，围腔排列，球形的细胞核染色较深；支持细胞位于底部基膜之上，细

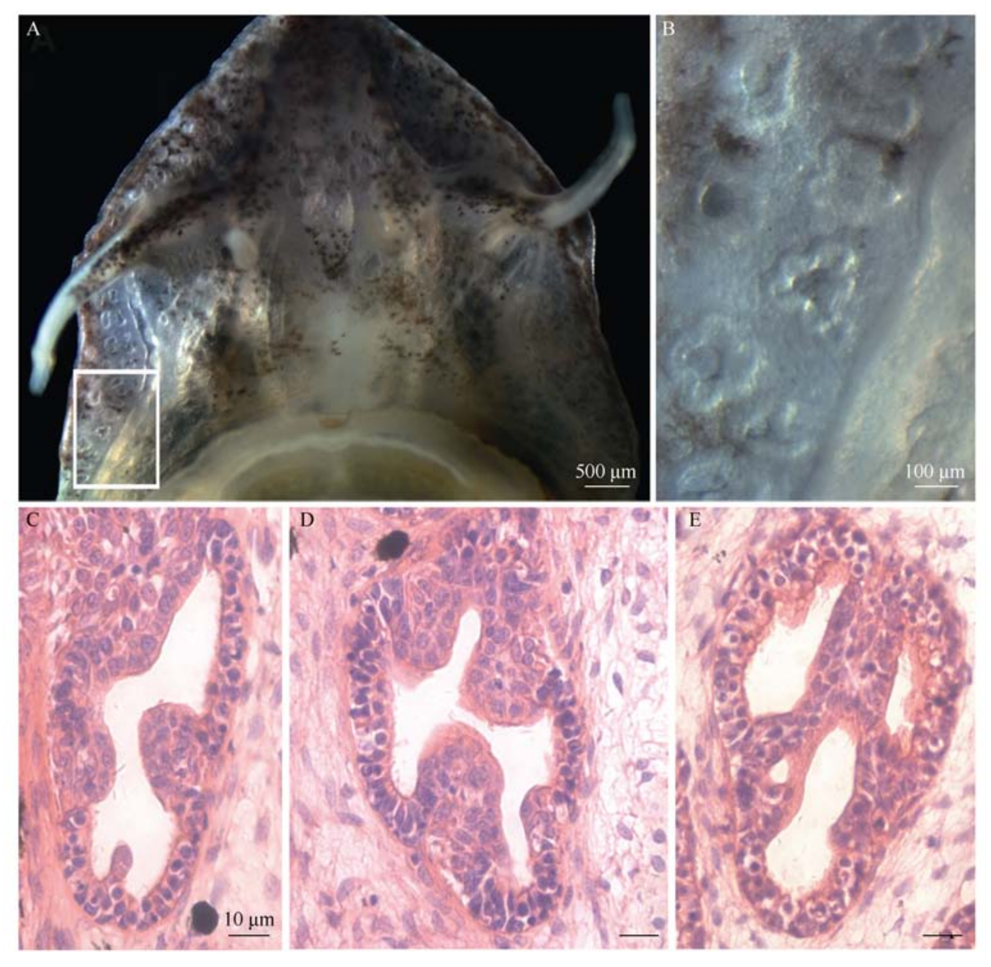


图 5　吻部腹面壶腹器官表皮细胞向壶腹器官中央区域覆盖示意图

Fig.5　Micrographs of the epidermal cells surrounded some single openings of the ampullary organs at the ventral surface of the head migrating toward the central area of the ampullary organs

A) 29 日龄头部腹面; B) A 中白色方框放大图; C, D, E) 29 日龄，壶腹器官横切图。

A) the ventral surface of the head at day 29 post hatching; B) higher magnification of ampullae shown in white frame of A; C, D, E) a horizontal section through an ampullary organ at 29 post hatching.

胞质延伸通向腔内，将感觉细胞隔开(图 4D)。大部分壶腹器官分布在神经丘两侧(图 4E)，也有单侧分布，例如它们只单侧存在于听侧线管背部。鳃盖处壶腹器官除外，鳃盖处未发现神经丘的存在。

扫描电镜下, 7 日龄，壶腹器官原基已在前背侧基板、前腹侧基板、听基板、横枕基板中形成(图 6A)。9 日龄，壶腹器官主要分布在吻部腹面两侧(图 6B)，并且出现单个发育完善的壶腹器官，吻部两侧及背面、鳃盖等处陆续有壶腹器官原基形成。15 日龄，吻部腹面中央壶腹器官表皮开口增多(图 6C)，从开口处可见管内有大量的黏液物质存在。有少量壶腹器官在吻部两侧及背面、鳃盖等处出现。29 日龄，壶腹器官布满整个吻部腹面(图 6D)，从壶腹器官表皮开口可见管底有大量微绒毛分布(图 6E)。36 日龄，吻部腹面开始出现多个壶腹器官聚集成簇，初具“梅花状”。57 日龄，吻部腹面可见 3～4 个壶腹器官聚集在一起，呈“梅花状”，分布紧密，并且该部分皮肤表面凹陷，形成花朵状凹穴(图 6F)。

2.3　侧线管道的形成

头部侧线管道的形成。9 日龄，管道神经丘全部出现在皮肤表面，神经丘及神经丘之间的表皮略有凹陷，侧线管道开始形成(图 7A)。15 日龄，管道上皮继续下陷，呈沟状，形成开放式管道(图 7B)。36 日龄，管道下陷明显，周围有软骨组织生成(图 7C)。49 日龄，管道底部变宽，神经丘位于底部中间，管道上方开始闭合(图 7D)。52 日龄，侧线管道完全封闭，并被软骨包围，近圆形，周围有少量黑色色素分布(图 7E)。眶上管、听管、颞管、横枕管形成较眶下管略早些。随着仔鱼的生长，侧线管道直径不断增大。

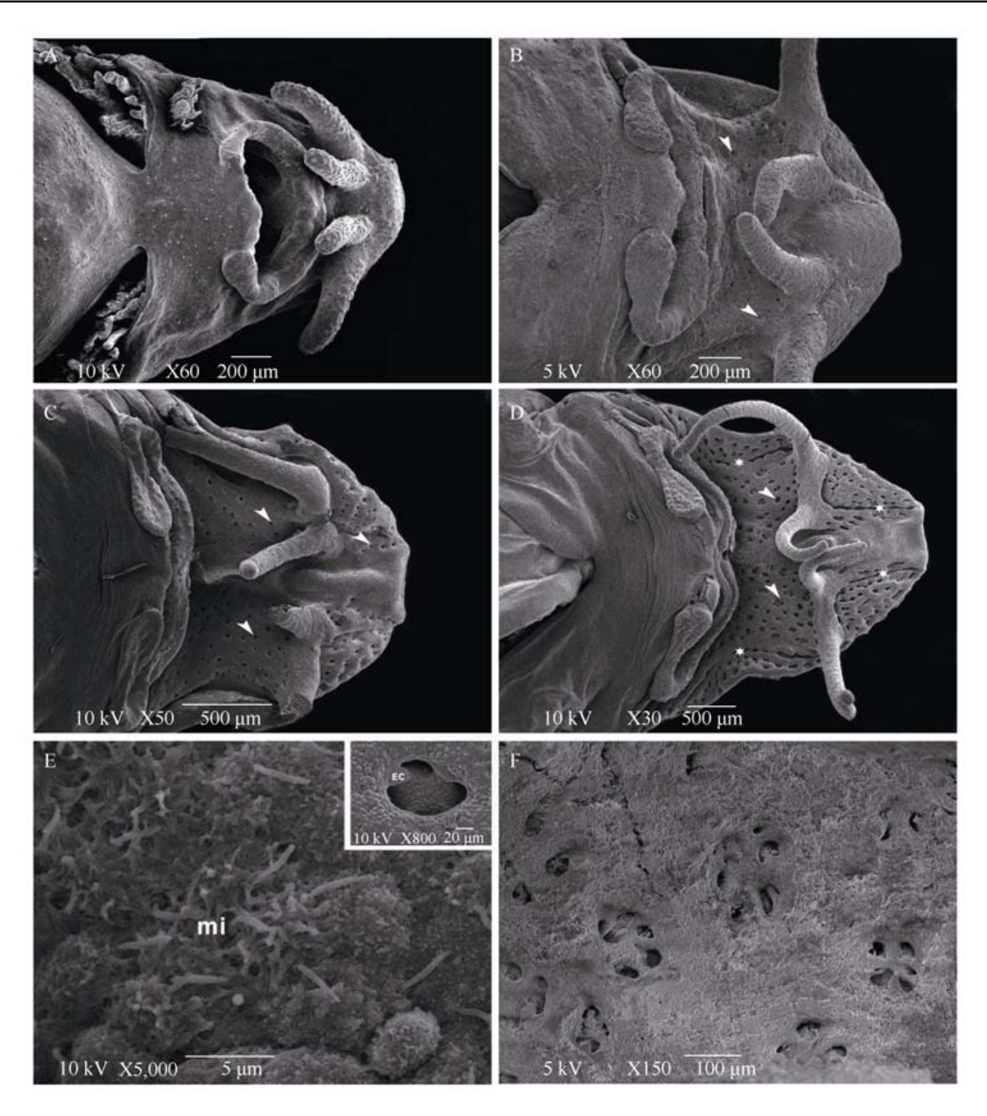


图 6　头部腹面壶腹器官发育图

Fig.6　Scanning electron micrographs of various stages in the development of ampullary organs on the ventral rostrum

A) 7 日龄头部腹面; B) 9 日龄头部腹面, 箭头, 壶腹器官; C) 15 日龄头部腹面, 箭头, 壶腹器官; D) 29 日龄头部腹面, 箭头, 壶腹器官, *：侧线管; E) 29 日龄壶腹底部存在大量的微绒毛, 内插图为壶腹开口低倍放大图; F) 57 日龄, 吻部腹面可见 3～4 个壶腹器官聚集在一起。 mi: 微绒毛。

A) the ventral surface of the head at day 7 post hatching; B) the ventral surface of the head at day 9 post hatching. Arrowhead, ampullary organs; C) the ventral surface of the head at day 15 post hatching. Arrowhead, ampullary organs; D) the ventral surface of the head at day 29 post hatching. Arrowhead, ampullary organs; asterisk, lateral line canal; E) high magnification showing the clusters of microvilli covering the floor of the ampulla at day 29 post hatching. Insert: A low power scaning electron micrograph looking down into an ampulla, revealing clusters of microvilli on the floor of the ampulla. F) the ampullary organs are arranged in clusters of 3−4 at the ventral surface of the head at day 57 post hatching. mi: microvilli.

躯干侧线管道与头部管道发育相似(图 8), 躯干侧线管道直径比头部要小。57 日龄, 侧骨板发育完全, 躯干侧线管道已完全埋于侧骨板中, 并且被软骨包围(图 8E), 在每一骨板鳞片上均有一小孔与外界相连。

3　讨　论

从胚胎发育的观点看, 神经系统的组成成分主要来源于神经胚的两部分：神经嵴和外胚层板。神经嵴起源于神经管最靠背部的区域, 能迁移至身体不同部位, 产生各种类型分化细胞, 主要包括感觉交感和副交感神经系统的神经元和胶质细胞、肾上腺的髓质细胞、表皮中的黑色素细胞, 以及头部的骨骼和结缔组织成分(Baker, 2008; Dupin et al, 2007)；外胚层板是由胚胎头部特定区域的外胚层增厚单独形成的, 能发育形成各种感觉细胞及其神经节, 主要包括嗅基板、听基板、三叉基板、深基板及侧线基板等(Baker et al, 2008; Schlosser, 2006,

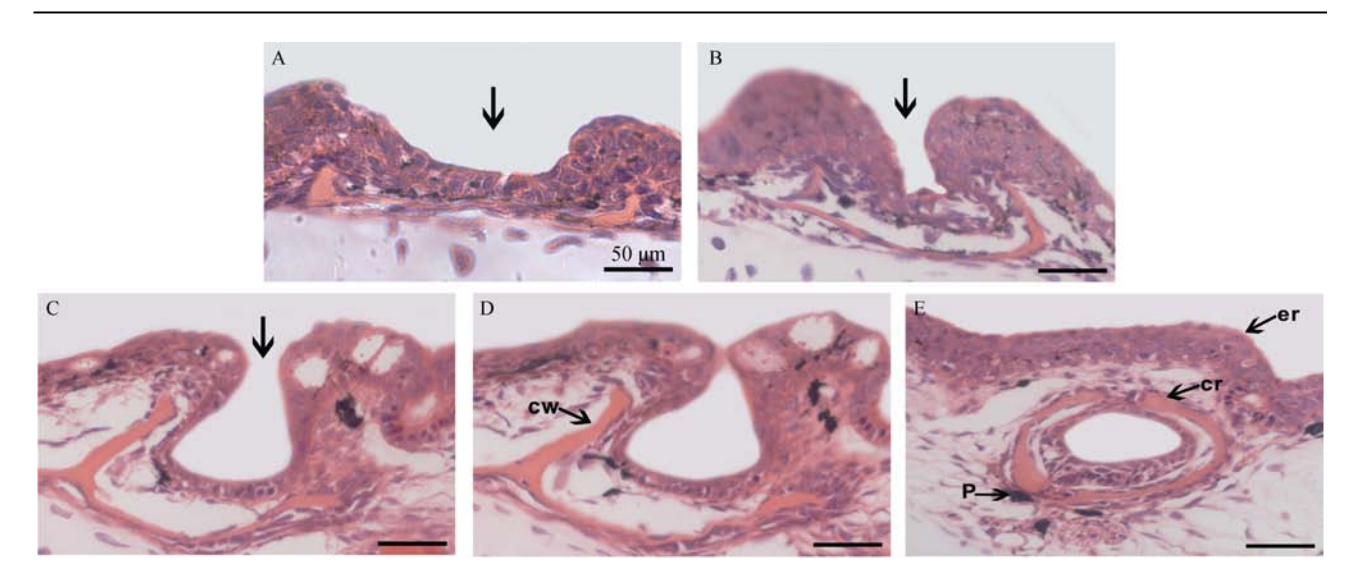


图 7 头部侧线管道发育图

Fig.7 Micrographs under optical microscope of lateral line canal of head at different development stages

A) 9 日龄管道纵切; B) 15 日龄管道纵切; C) 36 日龄管道纵切; D) 49 日龄管道纵切; E) 52 日龄管道纵切。cw：骨化的管道壁; er：上皮细胞顶; cr：固化的管道顶部; P：色素。

A) a vertical section through the canal at day 9 post hatching; B) a vertical section through the canal at day 15 post hatching; C) a vertical section through the canal at day 36 post hatching; D) a vertical section through the canal at day 49 post hatching; E) a vertical section through the canal at day 52 post hatching. cw: ossified canal walls; er: epithelial roof; cr: ossified canal roof; P: pigments.

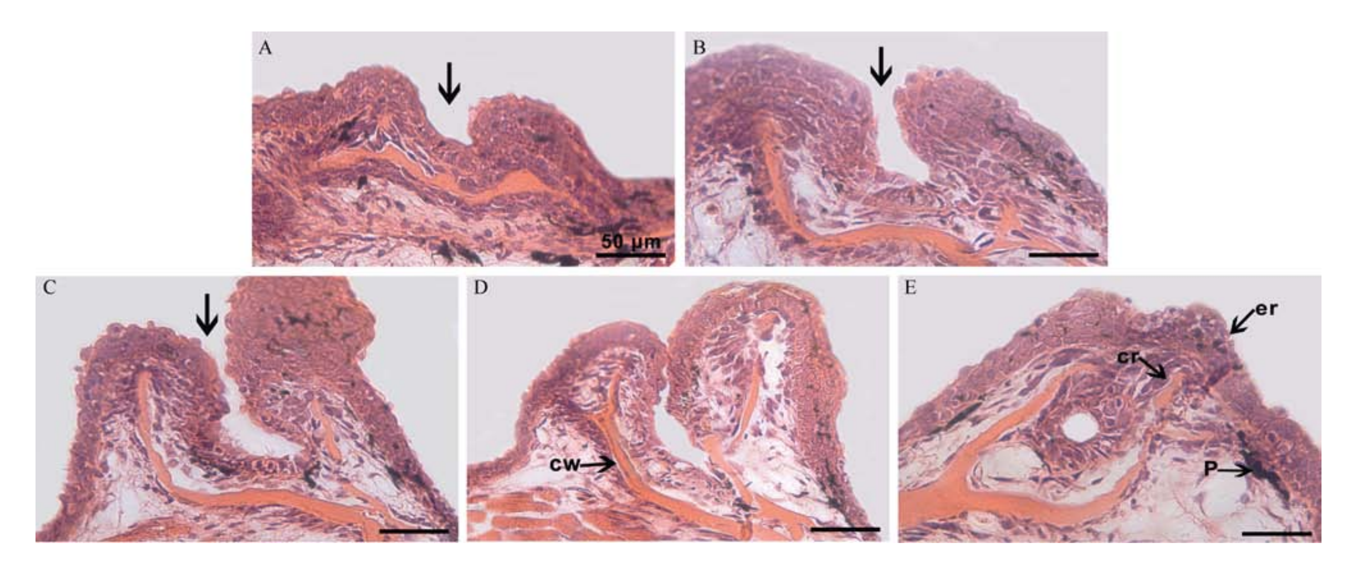


图 8 躯干侧线管道发育图

Fig.8 Micrographs under optical microscope of lateral line canal of trunk at different development stages

A) 9 日龄管道纵切; B) 15 日龄管道纵切; C) 36 日龄管道纵切; D) 49 日龄管道纵切; E) 57 日龄管道纵切。 cw： 骨化的管道壁; er：上皮细胞顶; cr：固化的管道顶部; P：色素。

A) a vertical section through the canal at day 9 post hatching; B) a vertical section through the canal at day 15 post hatching; C) a vertical section through the canal at day 36 post hatching; D) a vertical section through the canal at day 49 post hatching; E) a vertical section through the canal at day 57 post hatching. cw: ossified canal walls; er: epithelial roof; cr: ossified canal roof; P: pigments.

2008)。Northcutt et al (1995)运用组织嫁接和组织切除等实验手段，证实蝾螈侧线系统由侧线基板发育而来；侧线基板分布在在耳部前后外胚层增厚区域；神经丘在侧线基板的中央区域形成，壶腹器官在侧线基板的两侧区域形成。O'Neill et al (2007)从分子生物学方面在小点猫鲨(*Scyliorhinus canicula*)中，证明转录辅助因子 *Eya4* 能在侧线系统发育的整个过程中表达，包括在所有的侧线基板中和感觉嵴阶

段；而壶腹器官是在感觉嵴阶段形成，证明了鲨鱼的电感受器起源于侧线基板，并且发现转录因子 *Tbx3* 是鲨鱼侧线神经系统的特定标记。本文研究表明，西伯利亚鲟仔鱼听囊前后外胚层增厚区域存在 6 对侧线基板，除后侧线基板细胞向躯干迁移外，其他侧线基板都形成一短暂性存在的感觉嵴结构；神经丘在感觉嵴的中央区域形成，壶腹器官在感觉嵴的两侧形成；壶腹器官的发育比神经丘晚一周左右，这与蝾螈侧线发育模式相似(Northcutt et al, 1994, 1995)。目前有学者通过研究认为神经嵴细胞也参与的侧线系统的发育，比如 Collazo et al (1994) 运用胚胎预定命运图绘制技术，研究表明斑马鱼、条鳍鱼、蝾螈侧线系统具有双重起源，既起源于外胚层板，又起源于神经嵴，但是由于在神经胚期神经嵴细胞和外胚层板细胞混合在一起，通过向胚胎注射 DiI 难以区分细胞的种类。基于电感受器中基因 *Sox8* 和 HNK1 抗体的交叉反应, Freitas et al (2006) 认为鲨鱼的电感受器起源于神经嵴细胞，但是该实验所用都不是神经嵴细胞特定的标记物。本研究通过组织学和扫描电镜观察，为西伯利亚鲟侧线发育的研究提供形态学方面证据。为进一步认识侧线发育过程，需要运用分子生物学和细胞生物学等手段，对侧线发育相关功能基因表达及细胞迁移等进行研究。

前腹侧基板一般能发育形成前鳃盖下颌管。密西西比铲鲟的前腹侧基板虽没有形成管道结构，但在鳃盖处出现 5 个神经丘(Gibbs & Northcutt, 2004)。 在西伯利亚鲟中前腹侧基板仅发现有少量的壶腹器官，没有神经丘的结构出现。壶腹器官一般在神经丘的两侧都有分布(Northcutt et al, 1994)，在西伯利亚鲟及其他鲟科鱼类中，听侧线管的腹侧没有壶腹器官分布，仅在其背侧有壶腹器官分布(Gibbs & Northcutt, 2004)。这些发育特点差异性可能与个体及其生存环境适应性有关，也可能是侧线系统进化的表现。

29 日龄，在吻部腹面两侧可见少数个别的壶腹器官表皮细胞覆盖壶腹器官中央区域留下 3～4 个小的开口。壶腹器官表皮细胞这种特殊的迁移尚未在国内外相关研究文献报道。壶腹管内可见大量的微绒毛存在，在其他鲟形目鱼类、多鳍鱼、软骨鱼类中也存在类似的结构(Camacho et al, 2007)。

在我国，虽然西伯利亚鲟已突破了全季节全人工催产和人工受精技术(Zhuang et al, 2009)，但是仔鱼培育阶段必要时候仍需要使用加热装置进行控温，一般在小水体中常使用加热棒控温，加热棒一般分为铜加热棒和玻璃加热棒两种，由于鲟鱼类壶腹器官能检测水环境下周边微弱电流，对金属极为敏感，产生逃避行为(Gurgens et al, 2000; Teeter et al, 1980)。西伯利亚鲟仔鱼在 9 日龄初次摄食阶段已有壶腹器官发育成熟，用铜加热棒可能会使西伯利亚鲟出现慌乱逃窜行为，影响其摄食及正常生长，并导致大批量死亡。

参考文献：

Baker CVH. 2008. The evolution and elaboration of vertebrate neural crest cells[J]. *Curr Opin Genet Dev,* **18**(6): 536-543.

Baker CVH, Bronner-Fraser M. 2001. Vertebrate cranial placodes I. Embryonic induction[J]. *Dev Biol,* **232**(1): 1-61.

Baker CVH, O'Neill P, McCole RB. 2008. Lateral line, otic and epibranchial placodes: Developmental and evolutionary links?[J]. *J Exp Zool B: Mol Dev Evol,* **310**(4): 370-383.

Camacho S, Del Valle Ostos M, Llorente JI, Sanz A, García M, Domezain A, Carmona R. 2007. Structural characteristics and development of ampullary organs in *Acipenser naccarii*[J]. *Anat Rec,* **290**(9): 1178-1189.

Cheng H, Huang SQ, Heatwole H. 1995. Ampullary organs, pit organs, and neuromasts of the Chinese giant salamander, *Andrias davidianus*[J]. *J Morphol,* **226**(2): 149-157.

Collazo A, Fraser SE, Mabee PM. 1994. A dual embryonic origin for vertebrate mechanoreceptors[J]. *Science,* **264**(5157): 426-430.

Dupin E, Calloni G, Real C, Gonçalves-Trentin A, Le Douarin NM. 2007. Neural crest progenitors and stem cells[J]. *C R Biol,* **330**(6-7): 521-529.

Freitas R, Zhang GJ, Albert JS, Evans DH, Cohn MJ. 2006. Developmental origin of shark electrosensory organs[J]. *Evol Dev,* **8**(1): 74-80.

Gibbs MA. 2004. Lateral line receptors: Where do they come from developmentally and where is our research going?[J]. *Brain Behav Evol,* **64**(3): 163-181.

Gibbs MA, Northcutt RG. 2004. Development of the lateral line system in the shovelnose sturgeon[J]. *Brain Behav Evol,* **64**(2): 70-84.

Gisbert E, Ruban GI. 2003. Ontogenetic behavior of Siberian sturgeon, *Acipenser baerii*: A synthesis between laboratory tests and field data[J]. *Environ Biol Fish,* **67**(3): 311-319.

Gisbert E, Williot P. 2002. Advances in the larval rearing of Siberian sturgeon[J]. *J Fish Biol,* **60**(5): 1071-1092.

Gisbert E, Williot P, Castelló-Orvay F. 1999. Behavioural modifications in the early life stages of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*, Brandt)[J]. *J Appl Ichthyol,* **15**(4-5): 237-242.

Goulet J, Engelmann J, Chagnaud BP, Franosch JMP, Suttner MD, Van Hemmen JL. 2008. Object localization through the lateral line system of fish: theory and experiment[J]. *J Comp Physiol A,* **194**(1): 1-17.

Gurgens C, Russell DF, Wilkens LA. 2000. Electrosensory avoidance of metal obstacles by the paddlefish[J]. *J Fish Biol,* **57**(2): 277-290.

Hofmann MH, Wojtenek W, Wilkens LA. 2002. Central Organization of the Electrosensory System in the Paddlefish (*Polyodon spathula*)[J]. *J*

Comp Neurol, **446**(1): 25-36.

Lin X. 2003. Preliminary study on growth characteristics of juvenile *Acipenser Baeri*[J]. *J Putian Univ,* **10**(3): 30-33. [林星. 2003. 西伯利亚鲟稚幼鱼生长特征的初步研究. 莆田学院学报, **10**(3): 30-33.]

Ma J. 2007. Studies on the Early Development and Growth Pattern of Chinese Sturgeon, *Acipenser sinensis*, and *Amur sturgeon*, *Acipenser schrenckii*[D]. Master thesis, Shanghai Fisheries University, Shanghai. [马境. 2007. 中华鲟和施氏鲟胚后发育及生长研究[D]. 硕士学位论文, 上海水产大学, 上海.]

Mogdans J, Geisen S. 2009. Responses of the goldfish head lateral line to moving objects[J]. *J Comp Physiol A,* **195**(2): 151-165.

Northcutt RG. 1992. Distribution and innervation of lateral line organs in the axolotl[J]. *J Comp Neurol,* **325**(1): 95-123.

Northcutt RG, Brändle K, Fritzsch B. 1995. Electroreceptors and mechanosensory lateral line organs arise from single placodes in axolotls[J]. *Dev Biol,* **168**(2): 358-373.

Northcutt RG, Catania KC, Criley BB. 1994. Development of lateral line organs in the axolotl[J]. *J Comp Neurol,* **340**(4): 480-514.

O'Neill P, McCole RB, Baker CVH. 2007. A molecular analysis of neurogenic placode and cranial sensory ganglion development in the shark, *Scyliorhinus canicula*[J]. *Dev Biol,* **304**(1): 156-181.

Rodríguez A, Gisbert E. 2002. Eye development and the role of vision during Siberian sturgeon early ontogeny[J]. *J Appl Ichthyol,* **18**(4-6): 280-285.

Schlosser G. 2006. Induction and specification of cranial placodes[J]. *Dev Biol,* **294**(2): 303-351.

Schlosser G. 2008. Do vertebrate neural crest and cranial placodes have a common evolutionary origin?[J]. *BioEssays,* **30**(7): 659-672.

Song JK, Yan HY, Popper AN. 1995. Damage and recovery of hair cells in fish canal (but not superficial) neuromasts after gentamicin exposure[J]. *Hearing Res,* **91**(1-2): 63-71.

Song W, Song JK, Fan CX, Zhang T, Wang B. 2010. Studies on the early embryonic development of artificially-bred Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*)[J]. *J fish Chn,* **34**(5): 777-785. [宋炜, 宋佳坤, 范纯新, 张涛, 王斌. 2010. 全人工繁殖西伯利亚鲟的早期胚胎发育. 水产学报, **34**(5): 777-785.]

Teeter JH, Sznmier RB, Bennett MVL. 1980. Ampullary electroreceptors in the sturgeon *Scaphirhynchus platorynchus* (Rafinesque)[J]. *J Comp Physiol,* **138**(3): 213-223.

Wang W, Zhu H, Hu HX, Tian ZH, Dong Y. 2009. Heteroplasmy in mtDNA control region and phylogenetics of five sturgeon[J]. *Zool Res,* **30**(5): 487-696. [王巍, 朱华, 胡红霞, 田照辉, 董颖. 2009. 五种鲟鱼线粒体控制区异质性和系统发育分析. 动物学研究, **30**(5): 487-496.]

Wilkens LA, Hofmann MH. 2007. The paddlefish rostrum as an electrosensory organ: A novel adaptation for plankton feeding[J]. *Bioscience,* **57**(5): 399-407.

Zhuang P, Song C, Zhang LZ, Zhang T, Huang XR, Wang B. 2009. Allometric growth of artificial bred Siberian sturgeon *Acipenser baeri* larvae and juveniles[J]. *Chn J Ecol,* **28**(4): 681-687. [庄平, 宋超, 章龙珍, 张涛, 黄晓荣, 王斌. 2009. 全人工繁殖西伯利亚鲟仔稚鱼发育的异速生长. 生态学杂志, **28**(4): 681-687.]

（下转第 303 页）

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 271−275 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03271

中国穿山甲与爪哇穿山甲甲片异速生长分析及其在司法鉴定中的应用

周昭敏*, 赵 宏, 张忠旭, 王泽晖, 王 晗

(云南云林司法鉴定中心, 云南 昆明 650224)

摘要：甲片对于穿山甲具有重要的防护功能, 其形态差异反映了穿山甲对不同环境的适应性进化。该文对 35 只中国穿山甲和 119 只爪哇穿山甲甲片干重的异速生长模式进行了比较分析。结果表明, 爪哇穿山甲较中国穿山甲的甲片干重相对于头体长具有更高的异速生长速率(P=0.005)：爪哇穿山甲的甲片干重相对于头体长具有正的异速生长速率(b=3.725, P=0.001), 而中国穿山甲的甲片干重相对于头体长则是等速生长(b=3.105, P=0.054)。这可能是由于较低纬度地区生活的爪哇穿山甲较较高纬度地区生活的中国穿山甲受到了更大的捕食压力影响。由于穿山甲甲片是一种重要传统中药材原料, 相关违法贸易案件频发, 且数量巨大。为推算穿山甲的涉案个体数量, 建议这两种穿山甲甲片干重与个体数的换算标准为中国穿山甲 573.47 g, 爪哇穿山甲 360.51 g, 但是当两种穿山甲大量甲片混合在一起时，建议采用上述两个参数的平均值, 即 466.99 g，以此为穿山甲甲片贸易案件的司法鉴定以及司法审判中的定罪量刑提供依据。

关键词：穿山甲; 甲片; 功能形态; 异速生长; 司法鉴定
中图分类号：Q959.835; Q958.11; DF8 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0271-05

Allometry of scales in Chinese pangolins (*Manis pentadactyla*) and Malayan pangolins (*Manis javanica*) and application in judicial expertise

ZHOU Zhao-Min*, ZHAO Hong, ZHANG Zhong-Xu, WANG Ze-Hui, WANG Han

(*Yunnan Yunlin Forensic Center*, *Kunming* 650224, *China*)

Abstract: Pangolins are unique mammals in that they possess scales that serve a protective biological function. As an important raw material of traditional medicine, illegal trades of these scales are frequent and difficult to investigate or prosecute. We used allometric models of dry weight of scales to compare 35 Chinese pangolins (*Manis pentadactyla*) and 119 Malayan pangolins (*Manis javanica*). Our results showed that the dry weight of scales increases significantly faster with the length of head and body in Malayan pangolins (P=0.005), while dry weight of scales is positive (slope=3.725) in Malayan pangolins but isometric (slope=3.105) in Chinese pangolins. The differences in morphology between these species may reflect an evolutionary adaptation to different environments; Malayan pangolins in tropical regions appear to suffer from greater predation pressure than Chinese pangolins in temperate regions. We advise the conversion standards between dry weight of scales and number of individuals as 573.47 g in Chinese pangolins and 360.51 g in Malayan pangolins respectively, and when two are mixed together, average above two parameters of the median at 466.99 g. We propose these measurements be used as judicial evidences in forensic identification of related cases.

Key words: Pangolin; Scale; Functional morphology; Allometry; Judicial evidence

如果生物的某一形态特征所具有的功能能够使得物种适合度收益大于损失, 则该形态将会维持或增强; 反之, 这一功能形态则会出现衰退，因此, 功能形态的差异可以反映出不同物种或种群对各

收稿日期：2011-12-23；接受日期：2012-03-27
基金项目：云南省森林公安局资助项目
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: zhouzhaomin@yahoo.cn
第一作者简介：周昭敏(1981 一), 男, 博士, 主要从事野生动物及其制品的司法鉴定,研究领域涉及动物分类学和宏生态学

自生活环境的适应情况，例如捕食压力的强弱程度对防御器官的功能形态具有直接影响(Phillips & Shine, 2005; Domenici et al, 2008)。

许多作为猎物的物种，其形态在进化过程中不断发生改变以降低被捕食风险(Leonard et al, 1999; Nakaoka, 2000; Relyea, 2001)。由于回避被捕食风险需要付出代价，许多物种抵御被捕食的能力是随着被捕食风险的强弱程度而相应地发生改变(Harvell, 1986; Katz & Dill, 1998; Tollrian & Harvell, 1999)，因此，在较高捕食压力环境下生活的猎物往往具有增强的防御功能(Bolser & Hay, 1996; Menge & Lubchenco, 1981; Pennings et al, 2001; Vermeij, 1978)。

取食压力呈现出明显的生物地理学模式，较低纬度的捕食和植食压力都更强(Bertness et al, 1981; Bolser & Hay, 1996; Fawcett, 1984; Gaines & Lubchenco, 1982; Heck & Wilson, 1987; Jeanne, 1979; Menge & Lubchenco, 1981; Pennings et al, 2001; Vermeij, 1978)。与较高纬度分布的同属或同种个体相比，较低纬度分布的被捕食者经受着更强的捕食压力，因此，其具有防御功能的形态在适应性进化过程中往往会得以增强(Bertness et al, 1981; Vermeij, 1978)。穿山甲的甲片具有重要的防御功能，一旦来不及逃至避难所躲避捕食者，就会全身蜷曲，并使甲片直立以阻止捕食者的攻击(Nowak, 1999)。

全世界的穿山甲共有 8 个种(Schlitter, 2005)。其中，中国穿山甲(*Manis pentadactyla*)和爪哇穿山甲(*M. javanica*)都只分布在印度马来地区，但是中国穿山甲的分布范围较爪哇穿山甲更趋于较高纬度地区：中国穿山甲的分布北限在长江一线(～N30°)，南限在泰国北部和缅甸(～S20°)；而爪哇穿山甲的分布则北限在中国云南(～N25°)，南限在婆罗洲一带(～S10°) (Nowak, 1999; Wu et al, 2005)。中国穿山甲和爪哇穿山甲分布区有交叠，但存在明显的纬度差异,前者分布区主要在温带；而后者的分布区主要在热带。本文拟对中国穿山甲和爪哇穿山甲的甲片干重进行异速生长分析，以揭示它们在不同捕食压力下的适应性进化。

穿山甲被列为我国Ⅱ级重点保护陆生野生动物和 CITES 附录-Ⅱ物种(CITES, 2010)，其甲片的贸易是被法律明文禁止的。《最高人民法院关于审理破坏野生动物资源刑事案件具体应用法律若干问题的解释》(法释[2000]37 号文)关于非法猎捕、杀害、收购、运输，以及出售珍贵、濒危野生动物刑事案件“情节严重”、“情节特别严重”的数量认定标准，规定了以涉案动物个体数量和价值标准的多少为定罪量刑依据。涉案动物制品的价值标准认定则是基于个体数量乘以相应物种的法定资源管理费，因此，涉案动物个体数量的认定是定罪量刑的必要条件。作为一种重要的传统中药材原料，穿山甲甲片的贸易案件频发，且数量巨大。以云南省森林公安局“四一六”和“一一 •.一五”特大穿山甲甲片走私案为例，这两个案子共查获约 1.09 t 甲片。然而，由于缺乏科学的转换标准，难以通过所查获穿山甲甲片的重量推测涉案的个体数量，进而确定其价值标准，因此，在异速生长分析的基础之上，本文将利用大量样本统计出中国穿山甲和爪哇穿山甲甲片干重与个体数的详细转换标准，为相关个体数的推测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

2009 年，云南省森林公安局在办理案件中查获了 154 只穿山甲(死体)，冰冻保存于云南省野生动物园。该批穿山甲包括 35 只中国穿山甲(15♂和 20♀)和 119 只爪哇穿山甲(58♂和 61♀)。

1.2 数据收集

用卷尺测量各个个体的头体长(length of head and body, LHB)、尾长(tail length)、后足长(length of hind feet, LHF)等 3 个指标，并对该批穿山甲进行水煮、剥片、晒干。为了尽量降低甲片含水量，从每个物种各选取 5 个个体的甲片作为样本，每隔一天监测一次，直至样本干重趋于稳定，至此，甲片露天晾晒时间共计 45 d。用电子秤(量程 2 000 g，分度值 0.01 g)测定各个体的甲片干重。

1.3 数据处理

异速生长分析的公式为 $Y=aX^b$，其中 X 为自变量，Y 为因变量，a 为异速生长常数，b 为异速生长指数(Peters, 1983)。头体长、尾长和后足长分别被定义为自变量 X，甲片干重则作为因变量。自变量为一维变量，而因变量为三维变量，因此，当 b=3.00 时，Y 与 X 间为等速生长；当 b>3.00 或 b<3.00 时，Y 对 X 分别为正或负的异速生长。各变量经过常用对数转换后，应用 RMA 软件(Bohonak, 2004)进行压轴回归分析(reduced major axis regression)，压轴

回归分析比最小二乘回归分析(least squares regressions)更适合应用于评价具有明显误差离散的两组变量的结构关系(Rayner, 1985)。其余统计则应用 SPSS17.0 软件进行分析。此外, 还统计了中国穿山甲和爪哇穿山甲单个个体甲片干重的算术平均值、极值和中位数。

2 结 果

2.1 异速生长

异速生长分析结果详见表 1、2。中国穿山甲的甲片干重与自变量的异速生长指数无显著的性别差异(头体长：P=0.101; 尾长：P=0.454; 后足长：P=0.937); 而爪哇穿山甲的甲片干重与头体长的相对生长速率无显著的性别差异(P=0.088), 但与尾长(P=0.034)和后足长(P=0.001)的异速生长指数有显著的性别差异。同时，两种穿山甲的甲片干重与头体长均有较高的相关系数, 于是我们选取头体长作为代表体形大小的指标。爪哇穿山甲与中国穿山甲甲片干重的异速生长指数存在显著性差异(P=0.005)。中国穿山甲的甲片干重与头体长呈等速生长(b=3.105, P=0.054); 而爪哇穿山甲的甲片干重与头体长呈正的异速生长(b=3.725, P=0.001)。

表 1 中国穿山甲甲片干重的压轴回归分析结果
Tab. 1 Summary of reduced major axis regression statistics for dry weight of scales in Chinese pangolins

变量 Variables	雄 Male (n=15)		雌 Female(n=20)		雄+雌 Male and female (n=35)	
	R^2	斜率 Slope (SE)	R^2	斜率 Slope (SE)	R^2	斜率 Slope (SE)
头体长 LHB	0.807	3.364 (0.410)	0.342	3.005 (0.342)	0.547	3.105 (0.364)
尾长 TL	0.738	3.173 (0.450)	0.600	2.896 (0.432)	0.667	3.004 (0.302)
后足长 LHF	0.712	3.997 (0.595)	0.309	6.605 (1.294)	0.524	4.772 (0.573)

表 2 爪哇穿山甲甲片干重的压轴回归分析结果
Tab. 2 Summary of reduced major axis regression statistics for dry weight of scales in Malayan pangolins

变量 Variables	雄 Male(n=58)		雌 Female (n=61)		雄+雌 Male and female (n=119)	
	R^2	斜率 Slope (SE)	R^2	斜率 Slope (SE)	R^2	斜率 Slope (SE)
头体长 LHB	0.918	3.884 (0.148)	0.763	3.697 (0.234)	0.861	3.725 (0.128)
尾长 TL	0.883	3.067 (0.140)	0.599	2.981 (0.246)	0.794	2.986 (0.125)
后足长 LHF	0.545	5.546 (0.500)	0.112	4.426 (0.543)	0.349	4.577 (0.341)

2.2 个体数推算

154 只穿山甲的平均甲片干重为(423.47±197.19) g (27.19~1121.07 g)。35 只中国穿山甲与 119 只爪哇穿山甲在单个个体甲片干重存在显著性差异(P<0.001)，并且上述异速生长分析结果也表明, 即使考虑到个体体形大小对甲片干重的影响, 两者的甲片干重依然存在显著性差异，因此, 有必要分别计算两种穿山甲的参数标准。35 只中国穿山甲的平均甲片干重为 (592.99±217.63) g (129.47~1121.07 g), 中位数为 573.47 g。119 只爪哇穿山甲的平均甲片干重为(373.61±160.43) g (27.19~824.54 g), 中位数为 360.51 g。

3 讨 论

猎物抵御被捕食风险的策略是多种多样的, 例如改变功能形态(Leonard et al, 1999; Nakaoka, 2000; Vermeij, 1978)、提高化学防御水平(Bolser & Hay, 1996; Pennings et al, 2001)以及行为方式和生境选择的转变(Bertness et al, 1981; Fawcett, 1984; Martin, 2000; Turner & Mittlebach, 1990)。本文证实了中国穿山甲和爪哇穿山甲这两个近缘物种在防御形态上的差异：中国穿山甲甲片干重相对于头体长是等速生长, 而爪哇穿山甲则呈正的异速生长。

捕食风险的强弱是与纬度高低有关的。高纬度地区的捕食压力较低已得到广泛的证明, 例如鸟类的巢捕食风险就随着纬度梯度增高而降低(McKinnon, 2010)，因此, 较低纬度分布的爪哇穿山甲比较高纬度分布的中国穿山甲承受着更高的捕食压力。相应地, 为了增强防御功能, 爪哇穿山甲的个体甲片干重为正的异速生长速率, 以实现其在高捕食压力下的适应性进化。

中国穿山甲与爪哇穿山甲在个体甲片干重生长

速率上的差异还提供了穿山甲这个支系在起源初期所处自然环境的信息。中国穿山甲的分布区主要在温带地区，其个体甲片干重与体形大小呈等比例增加，表明该物种为甲片发育所付出的代价处于理想的平衡状态；而在较低纬度地区生活的爪哇穿山甲为了抵御更高的捕食风险，其个体甲片干重与体形大小呈正比例增加，即为甲片的发育付出了更高的代价。一个成功的入侵物种往往会通过功能形态的适应性改变而适应新的生活环境(Phillips & Shine, 2005)，因此，穿山甲可能起源于温带地区，而爪哇穿山甲的祖先是后来迁入具有较高捕食压力的热带地区，同时爪哇穿山甲的个体甲片干重生长速率作为可塑的表型特征发生了相应的适应性进化，使得具有防御功能的甲片在形态上得以增强。发现于德国麦塞尔化石遗址(Messel fossil deposit)的始新世中期 *Eomanis* 化石是目前已知最古老的穿山甲化石(Franzen, 2005; Meredith et al, 2009)，这也佐证了我们关于穿山甲这一支系从高纬度地区向低纬度地区扩张的推测。

虽然国内还进行过穿山甲一些生理(Chen et al, 1991)和食物(Ke et al, 1999)方面的研究，但目前人们对其认识还是非常有限。在今后对穿山甲研究工作中，有两个方向是值得注意的：一是通过行为研究对比分析不同纬度分布的各穿山甲物种所承受的捕食压力差异；二是尽量将更多的物种纳入分析，毕竟全世界只有 8 种穿山甲。

由于在司法实践中涉案甲片往往数量巨大，且受穿山甲个体大小差异和不同部位甲片形态差异等因素的影响，因此，无法精确推算涉案甲片所对应的穿山甲个体数，只能采用某一较为合理的参数进行换算以满足司法需求。中位数与数据的排列位置有关，是一组数据中间位置上的代表值，不受数据极端值的影响，因此，极端数据的变动对中位数影响不大。相对于算术平均值和极值，中位数更适宜作为利用穿山甲甲片重量推测其个体数的标准参数。根据《司法鉴定程序通则》第二十二条之规定，司法鉴定应当依次遵循国家标准和技术规范，司法鉴定主管部门、司法鉴定行业组织或者相关行业主管部门制定的行业标准有和技术规范，该专业领域多数专家认可的技术标准和技术规范，最后是可以采用所属司法鉴定机构自行制定的有关技术规范，因此，在没有现成的标准和技术规范的情况下，我们建议在司法鉴定实践中利用穿山甲甲片干重推算其个体数时，具体转换参数为：中国穿山甲为 573.47 g；爪哇穿山甲为 360.51 g。中国穿山甲甲片甲片较厚，且背甲远端钝圆，而爪哇穿山甲甲片较薄，且背甲远端呈凸突状；但是当两种穿山甲大量甲片混合在一起，为了提高司法鉴定效率，以满足司法程序对时效的要求，建议采用上述两个参数的平均值，即 466.99 g。

致谢：感谢中国科学院昆明动物研究所王应祥研究员、蒋学龙研究员和西南林业大学刘宁教授在数据分析上给予的指导，以及云南野生动物园王建军先生在数据采集过程中提供的大力帮助。

参考文献：

Bertness MD, Garrity SD, Levings SC. 1981. Predation pressure and gastropod foraging: a tropical-temperate comparison[J]. *Evolution,* **35**(5): 995-1007.

Bohonak AJ. 2004. RMA, Version 1.17: Software for Reduced Major Axis Regression[M]. San Diego: San Diego State University.

Bolser RC, Hay ME. 1996. Are tropical plants better defended? Palatability and defenses of temperate vs. tropical seaweeds[J]. *Ecology,* **77**(8): 2269-2286.

Chen Q, Liu RQ, Wang YX, Shi LM. 1991. Studies on the mitotic chromosomes and meiotic synaptonemal complexes (SC) of Chinese pangolin (*Manis pentadactyla*)[J]. *Zool Res*, **12**(3): 299-304. [陈全，刘瑞清，王应祥，施立明. 1991. 中国穿山甲有丝分裂染色体和减数分裂联会复合体(SC)的研究. 动物学研究, **12**(3): 299-304.]

Domenici P, Turesson H, Brodersen J, Brönmark C. 2008. Predator-induced morphology enhances escape locomotion in crucian carp[J]. *Proc R Soc B: Biol Sci*, **275**(1631): 195-201.

Fawcett MH. 1984. Local and latitudinal variation in predation on an herbivorous marine snail[J]. *Ecology,* **65**(4): 1214-1230.

Franzen JL. 2005. The implications of the numerical dating of the Messel fossil deposit (Eocene, Germany) for mammalian biochronology[J]. *Ann Paléontol,* **91**(4): 329-335.

Gaines SD, Lubchenco J. 1982. A unified approach to marine plant-herbivore interactions. II. Biogeography[J]. *Annu Rev Ecol Syst,* **13**(1): 111-138.

Harvell CD. 1986. The ecology and evolution of inducible defenses in a marine bryozoan: cues, costs, and consequences[J]. *Am Nat,* **128**(6): 810-823.

Heck KL Jr, Wilson KA. 1987. Predation rates on decapod crustaceans in latitudinally separated seagrass communities: a study of spatial and temporal variation using tethering techniques[J]. *J Exp Mar Biol Ecol,* **107**(2): 87-100.

Jeanne RL. 1979. A latitudinal gradient in rates of ant predation[J]. *Ecology,* **60**(6): 1211-1224.

Katz LB, Dill LM. 1998. The scent of death: chemosensory assessment of

predation risk by prey animals[J]. *Ecoscience,* **5**(3): 361-394.

Ke YY, Chang H, Wu SB, Liu Q, Feng GX. 1999. A study of Chinese pangolin′s main food nutrition[J]. *Zool Res*, **20**(5): 394-395. [柯亚永, 常弘, 吴诗宝, 刘茜, 冯干新. 1999. 穿山甲主要食物营养成分研究. 动物学研究, **20**(5): 394-395.]

Leonard GH, Bertness MD, Yund PO. 1999. Crab predation, waterborne cues, and inducible defenses in the blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. *Ecology,* **80**(1): 1-14.

Martin TE, Martin PR, Olson CR, Heidinger BJ, Fontaine JJ. 2000. Parental care and clutch sizes in North and South American birds[J]. *Science,* **287**(5457): 1482-1485.

McKinnon L , Smith PA, Nol E, Martin JL, Doyle FI, Abraham KF, Gilchrist HG, Morrison RIG, Bêty J. 2010. Lower predation risk for migratory birds at high latitudes[J]. *Science,* **327**(5963): 326-327.

Menge BA, Lubchenco J. 1981. Community organization in temperate and tropical rocky intertidal habitats: prey refuges in relation to consumer pressure gradients[J]. *Ecol Monogr,* **51**(4): 429-450.

Meredith RW, Gatesy J, Murphy WJ, Ryder OA, Springer MS. 2009. Molecular decay of the tooth gene Enamelin (*ENAM*) mirrors the loss of enamel in the fossil record of placental mammals[J]. *PLoS Genet,* **5**(9): e1000634.

Nakaoka M. 2000. Nonlethal effects of predators on prey populations: predator-mediated change in bivalve growth[J]. *Ecology,* **81**(4): 1031-1045.

Nowak RM. 1999. Walker's Mammals of the World[M]. 6th ed. Baltimore: The Johns Hopkins University Press.

Pennings SC, Siska EL, Bertness MD. 2001. Latitudinal differences in plant palatability in Atlantic Coast salt marshes[J]. *Ecology,* **82**(5): 1344-1359.

Peters RH. 1983. The Ecological Implications of Body Size[M]. Cambridge: Cambridge University Press.

Phillips BL, Shine R. 2005. The morphology, and hence impact, of an invasive species (the cane toad, *Bufo marinus*): changes with time since colonisation[J]. *Anim Conserv,* **8**(4): 407-413.

Rayner JMV. 1985. Linear relations in biomechanics: the statistics of scaling functions[J]. *J Zool: A,* **206**(3): 415-439.

Relyea RA. 2001. Morphological and behavioral plasticity of larval anurans in response to different predators[J]. *Ecology,* **82**(2): 523-540.

Schlitter DA. 2005. Order pholidota[M] // Wilson DE, Reeder DM. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press, 530-531.

Tollrian RI, Harvell CD. 1999. The Ecology and Evolution of Inducible Defenses[M]. Princeton: Princeton University Press.

Turner AM, Mittlebach GG. 1990. Predator avoidance and community structure: interactions among piscivores, planktivores, and plankton[J]. *Ecology,* **71**(6): 2241-2254.

Vermeij GJ. 1978. Biogeography and Adaptation[M]. Cambridge: Harvard University Press.

Wu SB, Wang YX, Feng Q. 2005. A new record of Mammalia in China-Manis Javanica[J]. *Acta Zootaxon Sin,* **30**(2): 440-443. [吴诗宝, 王应祥, 冯庆. 2005. 中国兽类一新纪录——爪哇穿山甲. 动物分类学报, **30**(2): 440-443.]

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 276−282 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03276

小鼠发情周期卵泡发育动态及其对超数排卵的影响

朱 娜, 贾洪响, 刘晓坤, 赵晓娥, 魏 强, 马保华*

(西北农林科技大学 动物医学院 农业部动物生物技术重点实验室, 陕西 杨凌 712100)

摘要：该文探讨了小鼠发情周期中阴门状态、阴道脱落细胞类型变化规律、卵泡发育规律及其相互关系, 并比较了发情周期不同阶段的超排效果。结果表明, 采用阴门状态观察法和阴道脱落细胞涂片法, 能有效判断小鼠发情周期阶段。卵巢组织切片观察结果表明, 在发情周期不同阶段, 小鼠的卵泡发育和黄体的生成与消退存在明显的规律性变化; 小鼠发情周期中, 其阴门状态、阴道脱落细胞种类及卵泡发育动态之间存在相关关系; 发情周期不同阶段开始超排的小鼠, 其配种见栓率和回收胚胎平均数均存在明显差异, 发情前期显著优于发情后期与间情期(P<0.05), 并高于发情期, 但差异不显著(P>0.05)，即阴门状态观察法与阴道脱落细胞涂片法均可用于小鼠发情周期阶段的判断, 发情前期为最适宜的小鼠超排时期。

关键词：发情周期; 阴道脱落细胞; 卵泡发育; 超数排卵; 小鼠
中图分类号：Q492; Q954.431; Q959.837 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0276-07

Measuring the estrus cycle and its effect on superovulation in mice

ZHU Na, JIA Hong-Xiang, LIU Xiao-Kun, ZHAO Xiao-E, WEI Qiang, MA Bao-Hua*

(*Key Laboratory of Animal Biotechnology, Ministry of Agriculture, College of Animal Veterinary Medicine, Northwest A & F University, Yangling* 712100*, China*)

Abstract: This study compares superovulation efficiency during different stages of the estrus cycle in mice by investigating the pudendum appearance, vaginal epithelial cell type, and the follicular development dynamics, in relation to the estrus cycle. We determined the stages of the estrus cycle by observing the pudendum and making vaginal smears of the Kunming mouse, and ascertaining the follicular development by making paraffin sections. Based on the observation, mice in stages of proestrus, oestrus, metoestrus and dioestrus were superovulated respectively, and their follicular developments and embryo collection results were tracked to ascertain the appropriate estrus cycle stage for superovulation. Our data showed that pudendum appearance and vaginal smears could effectively distinguish different stages of the estrus cycle and that ovarian tissue observation showed that follicular development, corpus luteum formation and luteolysis were regular during the estrus cycle. Likewise, during the estrus cycle of the Kunming mouse, pudendum appearance, vaginal epithelial cell type and follicular development were relational to one another. Superovulating mice in different stages of the estrus cycle showed marked differences both in pregnancy rate and average number of embryos collected. Proestrus was significantly better than metoestrus and dioestrus (P<0.05), and better than oestrus, but the difference between them was not significant (P>0.05). We suggest that pudendum appearance and vaginal smears can be used to distinguish estrus cycle stages and that proestrus is the optimal stage of the estrus cycle for superovulation.

Key words: Estrus cycle; Vaginal epithelial cell; Follicular development; Superovulation; Mouse

小鼠因其繁殖率高、繁殖周期短等特点被常用于生物医学研究, 尤其是胚胎生物学和胚胎工程研究(Brooke et al, 2007; Ding et al, 2007; Martín-Coello et al, 2008)。超数排卵技术作为在同一时间段获得足够数量卵母细胞或胚胎的主要手段之一, 是开展胚胎生物学和胚胎工程研究的基础(Chen et al, 1991; He et al, 1999, 2005)。

小鼠超排效果除受小鼠日龄和超排激素剂量影响之外(Cui et al, 2012; Yang, 2007), 主要受超排注射促性腺激素时小鼠所处发情周期阶段的影响, 但国内外对于小鼠超排的适合发情周期阶段所获得的研究结果并不一致，如 Fu et al (2005) 研究表

收稿日期：2012-02-24；接受日期：2012-03-17
基金项目：中国科学院战略性先导科技专项(XDA04020222-03)
*通信作者(Corresponding author)，马保华(1965-), 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事动物细胞与胚胎工程研究。E-mail: mabh@nwsuaf.edu.cn
第一作者简介：朱娜(1986-), 在读硕士, 主要从事动物胚胎工程研究。E-mail：zhuna1119@126.com

明, 发情前期 ICR 小鼠超排后, 其见栓率、平均可用胚胎数均高于其他发情周期阶段的小鼠; Guo et al (2006)对昆白系小鼠的超排后, 结论为在小鼠发情前期的初期和间情期后期超排效果较好且两者差异不显著; 而 Redian et al (1994)和 Tarín et al (2002) 在不同品系小鼠的超排中则证明, 发情期超排小鼠效果最好, 发情后期和间情期超排效果较差。由于处于发情周期不同阶段的小鼠, 其卵泡发育情况及体内激素分泌存在差异(Palermo, 2007), 根据小鼠发情周期的卵泡发育规律和生殖内分泌变化, 可将小鼠发情周期分为发情前期、发情期、发情后期和间情期 (Redian et al, 1994), 其外部表现为阴门状态的周期性变化 (Nagy et al, 2002)。在小鼠超排研究中一般根据小鼠阴门状态的周期性变化对发情周期阶段进行判断, 但由于小鼠的品系或个体差异, 其发情周期各阶段长短、阴门状态变化存在差别, 导致对其阴门状态的观察结果有所差异。上述研究结果的差别, 除了所用促性腺激素来源和小鼠品系的不同, 各研究者所采用的判断发情周期阶段的方法和标准的不同可能是导致结果差异的主要原因。因此, 小鼠发情阶段的鉴定, 是进行小鼠有效超排的关键之一。

本研究以获得高效超排效果为主要目的, 结合小鼠阴门状态和阴道脱落细胞涂片观察, 判断其发情周期阶段, 并以卵巢组织切片验证其发情周期阶段的准确性, 进而在小鼠发情周期不同阶段进行小鼠超排, 追踪超排后卵泡发育情况和胚胎回收结果, 确定超排开始的适宜发情周期阶段, 为进一步提高小鼠超排效果及调整超排时间、满足空间胚胎发育研究的早期胚胎需求提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明系小鼠, 购自第四军医大学实验动物中心。饲养间保持 13 h/11 h 的明暗周期变化(7:00—20:00 光照), 自由采食、饮水。雌鼠体重～25 g, 雄鼠体重～35 g 时用于试验。

1.2 试剂

多聚甲醛、曙红 Y 及中性树胶购自国药集团化学试剂有限公司; 二甲苯及氯化钠购自天津博迪化工股份有限公司; 苏木色精购自上海青析化工科技有限公司; 无水乙醇购自西安三浦化学试剂有限公司; 鳞片状切片石蜡(熔点 58～60 ℃, LEICA 39601095); 切片石蜡(熔点 51～55 ℃)购自上海标本模型厂; 孕马血清促性腺激素 (pregnant mare serum gonadotropin, PMSG)及人绒毛膜促性腺激素(human chorionic gonadotrophin, hCG)购自宁波第二激素厂; 胎牛血清(fetal bovine serum, FBS, GIBCO 16000-044); 胚胎操作液(添加 5%FBS 的改良杜氏磷酸盐缓冲液(modified Dulbecco's phosphate buffer solution, mDPBS)), 使用 SIGMA 试剂和超纯水自制。

1.3 小鼠阴门状态观察

于超排当天 16：00, 固定雌鼠并翻提尾巴露出阴门, 观察其阴门开张、阴门黏膜颜色及外阴肿胀情况, 根据阴门状态观察结果将小鼠的发情周期阶段分为发情前期、发情期、发情后期和间情期, 并对阴门状态进行近距拍照。参考 Nagy et al(2002)所著《小鼠胚胎操作实验手册》及作者实验室以往的试验总结, 根据阴门状态判定小鼠发情周期阶段的主要依据为：发情前期小鼠阴道口应未开张或微开张、稍湿润, 有少量分泌物, 分泌物清亮, 阴门黏膜浅红色, 阴门皱襞轻微红肿; 发情期小鼠阴道口开张、较湿润, 有少量浆液状或稍粘稠分泌物, 阴门黏膜红色较深, 皱襞明显肿胀; 发情后期小鼠阴道口松弛或已关闭，其周边有少量浆液状或已凝固的白色分泌物, 阴门黏膜颜色变为肉红色至白色, 阴门皱襞肿胀逐渐消退; 间情期小鼠阴道口紧闭、无分泌物, 阴门黏膜呈苍白色, 阴门皱襞肿胀完全消退。

1.4 小鼠阴道脱落细胞涂片制作与观察

采用阴门状态观察法挑选处于发情周期不同阶段的雌鼠, 制作阴道脱落细胞涂片。雌鼠保定、暴露阴道口, 将吸有少量生理盐水的滴管伸入阴道口轻轻冲洗阴道, 反复冲吸几次后, 回吸一滴并滴于载玻片上, 制作涂片。进行 H.E.染色(苏木精染色 1 min、伊红染色 50 s), 随后冲片, 干燥, 镜检、显微摄影。通过阴道脱落细胞涂片观察, 对小鼠发情周期阶段进行进一步鉴定。发情前期阴道脱落细胞以部分角化上皮细胞为主; 发情期阴道脱落细胞以完全角化上皮细胞为主; 发情后期以白细胞和中间层细胞为主; 间情期为少量白细胞与中间层细胞(Bekyurek et al, 2002)。

1.5 小鼠卵巢石蜡切片制作

将已制作阴道脱落细胞涂片的小鼠处死, 分离其双侧卵巢, 剪去卵巢周围的结缔组织。将卵巢组织浸泡于 4%多聚甲醛中 24～48 h, 脱水、透明、包

埋, 制作连续石蜡切片(片厚 7 μm), H.E.染色, 中性树胶封片, 镜检、显微摄影。通过对小鼠卵巢石蜡切片的观察, 对阴门状态观察法和阴道脱落细胞涂片法判定小鼠发情周期阶段的准确性进行进一步验证。

1.6 小鼠的超排、配种、胚胎采集

在上述试验的基础上, 采用阴门观察法对处于发情前期、发情期、发情后期和间情期的小鼠进行超排处理, 每个阶段 30 只。超排程序为, 超排当天(0 d) 16：00 每只雌鼠腹腔注射 PMSG 10 IU, 48 h 后(2 d)腹腔注射 hCG 10 IU, 随即将超排雌鼠与单笼饲养的雄鼠按照 1∶1 比例合笼过夜配种。次日(3 d)上午 7：00 观察记录雌鼠阴门栓形成情况。每组超排小鼠于注射 PMSG 24 h 和 48 h 后(未注射 hCG)分别处死 3 只, 采集双侧卵巢制作石蜡切片、H.E.染色, 通过切片观察卵巢上卵泡发育情况。注射 PMSG 94 h 和 120 h 后, 颈椎脱臼分别各处死超排小鼠 12 只, 回收 2 细胞胚胎(输卵管)和 8 细胞及以上发育阶段胚胎(输卵管和子宫角)。无菌分离子宫角、输卵管和卵巢, 置于盛有胚胎操作液的表面皿中进行清洗后更换表面皿。输卵管胚胎回收时, 先用眼科剪剪断卵巢和输卵管之间的联系结构, 再剪断子宫与输卵管联结处, 将输卵管转移到盛有胚胎操作液的表面皿中, 置于实体显微镜载物台上, 在 30 倍镜下, 用一支眼科异物针固定输卵管, 另一支异物针撕开输卵管, 直至将整个输卵管撕裂, 胚胎会释放到胚胎操作液中, 在实体显微镜下检出胚胎; 子宫角胚胎回收时, 将子宫体及子宫角置于盛有胚胎操作液的表面皿中, 先用眼科剪纵向剪子宫角尖端, 用吸有胚胎操作液的 2 mL 一次性注射器从子宫体开口插入针头冲洗子宫腔, 使胚胎随着液体流动而被冲出子宫, 每侧用液体 1.0～1.5 mL, 之后再重复冲洗一次, 在实体显微镜下从冲出液中检出胚胎。检出胚胎用新鲜胚胎操作液清洗 3 次后, 于倒置显微镜下观察胚胎的形态质量并分别计数。

1.7 统计分析

数据处理及差异性分析均在 SPSS11.0 软件中进行。P<0.05 为差异显著, P≥0.05 为差异不显著。

2 结 果

2.1 小鼠发情周期不同阶段阴门外观

观察小鼠阴门状态, 并根据阴门状态判断小鼠发情周期阶段, 结果见图 1。

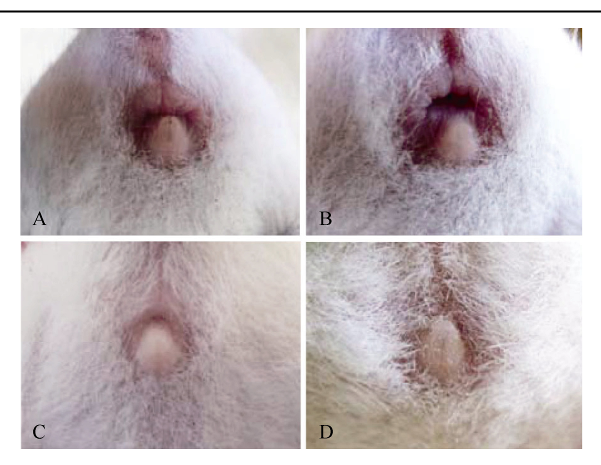


图 1 发情周期不同阶段阴门外观

Fig. 1 Pudendum appearance in different stages of the estrus cycle

A) 发情前期; B) 发情期; C) 发情后期; D) 间情期。

A) Proestrus; B) Oestrus; C) Metoestrus; D) Dioestrus.

2.2 小鼠发情周期不同阶段阴道脱落细胞涂片观察结果

小鼠发情周期不同阶段阴道脱落细胞涂片见图 2。处于发情前期的小鼠阴道脱落细胞以部分角化上皮细胞为主, 有少量完全角化上皮细胞, 细胞密度较小。其中, 部分角化上皮细胞为梭形或椭圆形, 可见明显的深紫色固缩核或淡染的紫红色细胞核, 细胞质呈浅紫色; 完全角化上皮细胞又称无核角化上皮细胞, 为无规则多边形, 大而扁平, 无细胞核, 细胞质呈浅红色(图 2A)。发情期小鼠阴道脱落细胞绝大部分为完全角化上皮细胞, 数量较多, 如同堆积的落叶(图 2B)。发情后期小鼠的阴道脱落

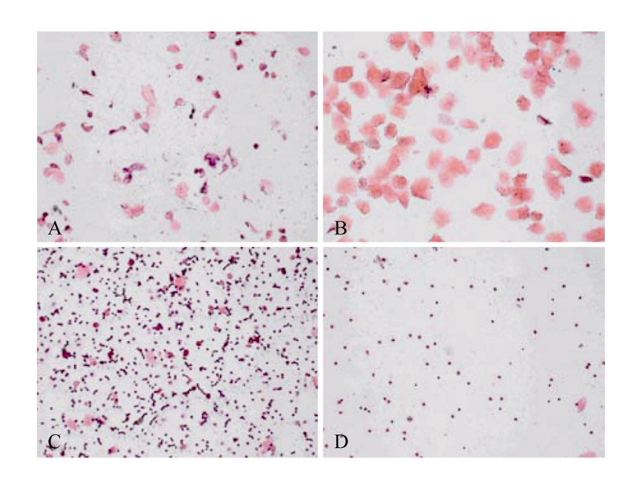


图 2 发情周期不同阶段阴道脱落细胞涂片(×200)

Fig. 2 Vaginal epithelial cells in different stages of the estrus cycle (×200)

A) 发情前期; B) 发情期; C) 发情后期; D) 间情期。

A) Proestrus; B) Oestrus; C) Metoestrus; D) Dioestrus.

细胞以白细胞为主，间或少量中间层细胞和完全角化上皮细胞。白细胞形态小而圆，细胞核较大，为马蹄状或分叶状，深紫色；细胞质为浅紫红色。中间层细胞呈鳞状，可见深蓝色圆形细胞核，胞质为浅紫色(图 2C)。间情期小鼠阴道脱落细胞数量较少，细胞种类以中间层细胞和白细胞为主，偶尔可见完全角化上皮细胞(图 2D)。

2.3　小鼠发情周期不同阶段卵巢组织切片

小鼠发情周期不同阶段卵巢组织切片见图 3。处于发情前期的小鼠，其卵巢皮质部分布较多发育中的有腔卵泡，卵泡腔体积较大，但卵泡未突出于卵巢表面(图 3A)。处于发情期的小鼠，其卵巢皮质部边缘分布较多的有腔卵泡，卵泡腔体积较大且卵泡壁较薄，多数突出于卵巢表面(图 3B)；处于发情后期的小鼠，其卵巢切面上主要为黄体分布，少见有腔卵泡(图 3C)；处于间情期的小鼠，其卵巢切面上可见较多黄体，在黄体之间分布有不同发育阶段的腔前卵泡或小腔卵泡(图 3D)。

2.4　发情周期不同阶段小鼠超排后不同时间卵泡发育情况

发情周期不同阶段小鼠超排后不同时间卵巢卵泡发育情况见图 4。发情前期的小鼠在注射 PMSG 24 h 后，卵巢切面可见数量较多的发育中的有腔卵泡分布，但基本未突出于卵巢表面，少见黄体(图 4A1)；注射 PMSG 48 h 后，卵巢皮质部边缘可见较多的有腔卵泡，卵泡腔体积较大，大部分卵泡突出于卵巢表面，少见黄体(图 4A2)。发情期小鼠注射 PMSG 24 h 后，其卵巢皮质部浅层可见多个卵泡，卵泡腔体积较大，部分卵泡向卵巢表面突出，少见黄体(图 4B1)；注射 PMSG 48 h 后，部分大的卵泡突出于卵巢表面，卵巢皮质部可见新形成的黄体(图 4B2)。发情后期小鼠注射 PMSG 24 h 后，其卵巢切面上可见有少数腔前卵泡、小腔卵泡和多个黄体(图 4C1)；注射 PMSG 48 h 后，可见卵巢切面上有少数有腔卵泡和多个黄体(图 4C2)。间情期小鼠注射 PMSG 24 h 后，卵巢皮质部可见多个腔前卵泡和发育中的有腔卵泡以及多个黄体(图 4D1)；注射 PMSG 48 h 后，卵巢皮质部浅层可见多个大的有腔卵泡，卵泡壁变薄，部分卵泡突出于卵巢表面，可见较少黄体(图 4D2)。

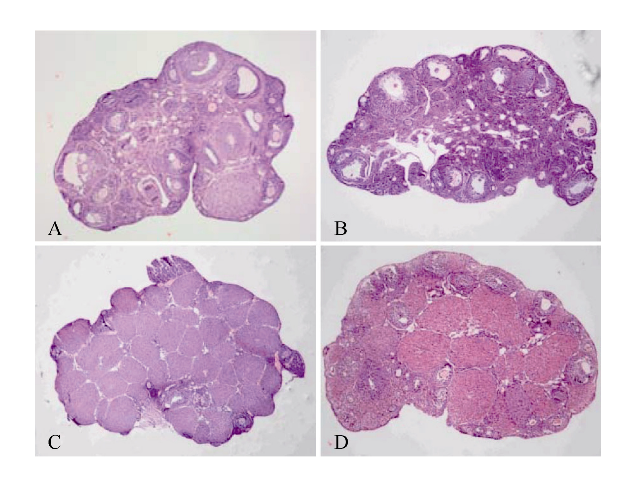


图 3　发情周期不同阶段卵巢组织切片(×40)

Fig. 3　Histological sections of ovaries in different stages of the estrus cycle

A) 发情前期; B) 发情期; C) 发情后期; D) 间情期。

A) Proestrus; B) Oestrus; C) Metoestrus; D) Dioestrus.

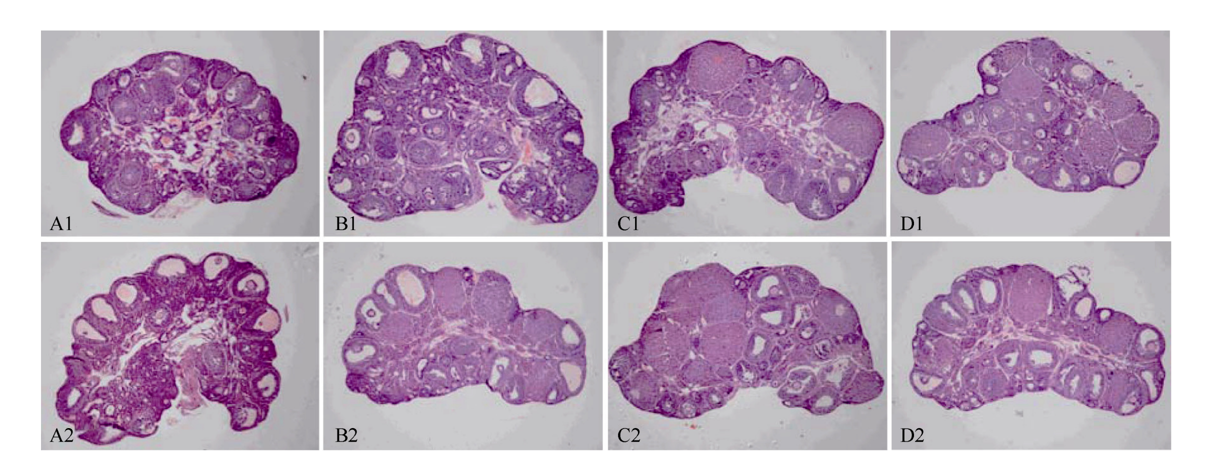


图 4　发情周期不同阶段注射 PMSG 后的卵巢组织切片(×40)

Fig. 4　Histological sections of ovaries injected with PMSG in different stages of the estrus cycle (×40)

A) 发情前期; B) 发情期; C) 发情后期; D) 间情期; 1) PMSG 注射后 24 h; 2) PMSG 注射后 48 h。

A) Proestrus; B) Oestrus; C) Metoestrus; D) Dioestrus; 1) Twenty-four hours after injection of PMSG; 2) Forty-eight hours after injection of PMSG.

2.5 发情周期不同阶段小鼠超排配种后的胚胎回收结果

发情周期不同阶段小鼠超排配种后，分别在注射 PMSG 94 h 和 120 h 回收胚胎，并分别计数发育到 2 细胞(或以上阶段，以 2 细胞计)和 8 细胞(或以上阶段，以 8 细胞计)胚胎数量，结果见表 1 和表 2。

表 1 发情周期不同阶段超排小鼠 PMSG 注射后 94 h 2 细胞胚胎回收结果

Tab. 1 The 2-cell embryo collection result at 94 h after PMSG injected of superovulation mouse in different stages of estrus cycle

超排开始时的发情周期阶段 Beginning of superovulation estrus cycle stage	超排鼠/只 Number of superovulated mice	见栓鼠/只(%) Number of mice with vaginal plud	回收到 2 细胞胚的小鼠数/只(%) Number of mice 2-cell embryos were collected from	超排小鼠 2 细胞胚胎平均数(mean±*SD*) Average number of 2-cell embryos in superovulated mice
发情前期 Proestrus	12	11(91.67) ^{a}	11(91.67)^{a}	36.92±17.83^{a}
发情期 Oestrus	12	9(75.00) ^{a}	9(75.00)^{ab}	27.25±20.87^{ab}
发情后期 Metoestrus	12	4(33.33) ^{b}	4(33.33)^{c}	8.33±17.05^{c}
间情期 Dioestrus	12	8(66.67) ^{ab}	6(50.00)^{bc}	14.33±17.33^{bc}

各栏组间上标字母相同者差异不显著，不同者差异显著。

Appearance of the same letter means there is no significant difference among the groups while different letters mean there is significant difference.

表 2 发情周期不同阶段超排小鼠 PMSG 注射后 120 h 8 细胞胚胎回收结果

Tab. 2 The 8-cell embryo collection results at 120 h after PMSG injection in different stages of the estrus cycle

超排开始时的发情周期阶段 Beginning of superovulation estrus cycle stage	超排鼠/只 Number of superovulated mice	见栓鼠/只(%) Number of mice with vaginal plud	回收到 8 细胞胚的小鼠数/只(%) Number of mice 8-cell embryos were collected from	超排小鼠 8 细胞胚胎平均数(mean±*SD*) Average number of 8-cell embryos in superovulated mice
发情前期 Proestrus	12	10(83.33) ^{a}	10(83.33)^{a}	26.42±17.67^{a}
发情期 Oestrus	12	8(66.67) ^{ab}	8(66.67)^{ab}	18.33±14.57^{ab}
发情后期 Metoestrus	12	5(41.67) ^{b}	4(25.00)^{b}	6.58±10.68^{b}
间情期 Dioestrus	12	8(66.67) ^{ab}	7(58.33)^{ab}	11.08±12.12^{b}

各栏组间上标字母相同者差异不显著，不同者差异显著。

Appearance of the same letter means there is no significant difference among the groups while different letters mean there is significant difference.

由表 1 和表 2 可以看出，发情周期不同阶段超排小鼠的见栓率、回收到胚胎的超排小鼠数和超排小鼠 2 细胞胚胎和 8 细胞胚胎平均数均存在组间差异。总体趋势为，发情前期显著优于发情后期与间情期($P<0.05$)，并高于发情期，但差异不显著($P>0.05$)。

3 讨 论

小鼠的发情周期一般为 4～5 d (Tarín et al, 2002)，不同阶段卵泡的不同发育状态会直接影响超排效果。所以，准确判断小鼠发情周期阶段，并在适宜阶段进行超数排卵，对获得有效超排结果具有重要意义。小鼠发情阶段的鉴定方法，目前常用的有阴门及其周围组织变化观察法和阴道脱落细胞涂片观察法(Goldman et al, 2007; Tsiligianni et al, 2004)。相对于小鼠阴门外观变化的观察，阴道脱落细胞是反应卵巢卵泡发育活动的较早且较准确的迹象，以上两种方法相结合可有效判断小鼠发情周期阶段(Kopp et al, 2006)。本研究首先采取阴门观察法初步判断小鼠的发情周期阶段，同时采集阴道脱落细胞制作涂片并镜检作进一步判断，最后采集卵巢制作组织切片，观察卵泡及黄体的发育与消退情况，对小鼠阴门状态观察法和阴道脱落细胞涂片法所判定的发情周期阶段准确性进行进一步验证。结果表明，阴门皱襞较为肿胀，黏膜浅红，阴道口微张且有清亮分泌物等为发情前期状态(图 1A)，其阴道脱落细胞以部分角化上皮细胞为主，含少量完全角化上皮细胞(图 2A)；卵巢组织切片可见大部分卵巢切面分布有较多发育中的有腔卵泡，卵泡腔体积较大，但卵泡未突出于卵巢表面(图 3A)。阴门皱襞明显肿胀，黏膜呈鲜红色，阴道口开张，有少量浆液状或粘稠分泌物等为发情期状态(图 1B)，其阴道脱落细胞绝大部分为完全角化上皮细胞(图 2B)；卵巢切面分布较多的有腔卵泡，卵泡腔体积较大且卵泡壁较薄，多数突出于卵巢表面(图 3B)。阴道口松弛或已

关闭，阴门黏膜颜色较浅且肿胀逐渐消退，周边有少量浆液状或已凝固的白色分泌物等状态为发情后期(图 1C)，其阴道脱落细胞以白细胞为主，间有少量中间层细胞和完全角化上皮细胞(图 2C)；卵巢切面主要为黄体分布(图 3C)。阴门皱襞不肿胀，黏膜苍白色，阴道口紧闭无分泌物等状态为间情期(图 1D)，阴道脱落细胞数量较少，以中间层细胞和白细胞为主(图 2D)；卵巢切面可见较多黄体，且黄体之间分布有不同发育阶段的腔前卵泡或小腔卵泡(图 3D)。由以上结果可见，当小鼠卵泡和黄体发育及消退呈周期性变化时，卵泡颗粒细胞分泌的雌激素和黄体细胞分泌的孕激素也随之呈周期性的改变，引起以阴门黏膜肿胀消长、黏膜颜色及阴道分泌物的改变为主要特征的阴门及其周围组织的周期性变化。而阴道黏膜上皮细胞在激素作用下，呈周期性的增殖、成熟及脱落，使阴道脱落细胞(如部分角化上皮细胞、完全角化上皮细胞、中间层细胞等)的类型和数量表现周期性变化(Catchpole et al, 2003)。同时，发情周期中发生的周期性阴道分泌物的增加与减少以及阴门的开张与闭合导致阴道酸性环境的改变，使阴道细胞类群中白细胞的数量表现周期性的增减变化(Zhang et al, 2006)。

在上述研究的基础上，对阴门观察法配合阴道脱落细胞涂片判断发情周期阶段的小鼠，分别于发情前期、发情期、发情后期和间情期进行超排处理。在注射 PMSG 后 24 h 和 48 h(未注射 hCG)，分别采集超排小鼠卵巢制作组织切片，追踪超排后卵泡发育情况；对完成超排注射程序并配种的小鼠，分别于注射 PMSG 94 h 和 120 h 处死、回收胚胎，并分别计数发育到 2 细胞(或以上阶段)和 8 细胞(或以上阶段)胚胎数量，比较发情周期不同阶段超排小鼠的超排、受精及胚胎发育情况(注：实验室尚未发表的超排小鼠胚胎发育时程研究证明，在注射 PMSG 94 h 和 120 h 后，2 细胞(或以上阶段)和 8 细胞(或以上阶段)胚胎比例达到峰值，故本研究选择这两个时段分别评价受精卵发育到 2 细胞和 8 细胞阶段的数量)。结果表明，发情前期小鼠在注射 PMSG 24 h 后，卵巢切面发育中的有腔卵泡数量较多，但尚未突出于卵巢表面(图 4A1)；注射 PMSG 48 h 后，卵巢切面边缘可见较多有腔卵泡，卵泡腔体积较大，且大部分卵泡突出于卵巢表面(图 4A2)。说明由于发情前期小鼠卵巢上有腔卵泡数量较多，在主要起促进有腔卵泡生长发育的促性腺激素(PMSG)作用下，多个有腔卵泡进一步生长发育成熟(Fortune, 2003)，并可能会在促进卵泡进一步成熟并排卵的促性腺激素(hCG)作用下最后发育成熟并排卵，获得较好的超排效果。2 细胞胚胎和 8 细胞胚胎回收结果也验证了卵泡发育的组织学追踪结果。对于发情期小鼠，在注射 PMSG 24 h 后，卵巢组织切面可见多个成熟卵泡(图 4B1)，并在注射 PMSG 48 h 后，已有部分成熟卵泡排卵、形成黄体，而另有部分卵泡陆续发育到三级卵泡和成熟卵泡阶段(图 4B2)。在这种情况下，虽然也可能会获得较好的超排效果，但由于出现超排程序中尚未注射排卵激素时即已发生部分卵泡的排卵，而造成排卵不整齐，受精后胚胎发育阶段不整齐，甚至使过早排卵的卵母细胞失去受精能力，而使正常发育的胚胎数量减少。该阶段小鼠胚胎回收结果表明，2 细胞胚胎和 8 细胞胚胎回收数量均低于发情前期超排小鼠，但差异不显著(P>0.05)。发情后期进行超排的小鼠，在注射 PMSG 24 h 后，其卵巢切面仅见少数腔前卵泡、小腔卵泡和多个黄体(图 4C1)；注射 PMSG 48 h 后，则有少数有腔卵泡和多个黄体(图 4C2)。这说明在这一时期开始超排，能够接受外源性促性腺激素刺激效应的有腔卵泡数量较少，不足以引起有效的超排结果。该阶段小鼠胚胎回收结果也说明了卵泡发育的追踪结果，其 2 细胞和 8 细胞回收数均显著低于发情前期超排小鼠(P<0.05)，同时 2 细胞回收数显著低于发情期超排小鼠。间情期小鼠超排注射 PMSG 24 h 后，卵巢切面可见多个腔前卵泡和发育中的有腔卵泡，以及多个黄体(图 4D1)；注射 PMSG 48 h 后，卵巢皮质部浅层可见多个大的有腔卵泡，卵泡壁变薄，部分卵泡突出于卵巢表面，可见较少黄体(图 4D2)。这说明在这一阶段开始超排的小鼠，由于卵巢上仍然存在黄体，并开始出现数量较多的腔前卵泡和小的有腔卵泡，外源性促性腺激素可诱导有腔卵泡进一步生长发育并成熟，从而起到一定的超排效果。胚胎回收结果表明，其超排结果显著低于发情前期小鼠(P<0.05)，虽与发情期小鼠差异不显著，但正常胚胎回收数明显偏低。

该结果说明，小鼠发情周期阴门状态和阴道脱落细胞类型的变化能够在一定程度上反映卵巢上卵泡发育和黄体形成与消退的动态变化，即通过阴门状态观察和阴道脱落细胞涂片观察，能够在一定程度上判断卵巢上卵泡发育和黄体形成与消退的动态变化，可以作为判断小鼠发情周期阶段的依

据。超排后 24 h 和 48 h 的卵泡发育追踪结果和之后的胚胎回收结果说明，处于发情周期不同阶段的小鼠超排后，其卵泡生长发育、成熟规律以及胚胎回收结果存在明显差异，其中发情前期小鼠超排后卵泡发育规律、正常发育成熟的卵泡数量及胚胎回收数量较为理想，是适宜超排的发情周期阶段。

参考文献：

Bekyurek T, Liman N, Bayram G. 2002. Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*) [J]. *Lab Anim,* **36**(1): 51-60.

Brooke DA, Orsi NM, Ainscough JFX, Holwell SE, Markham AF, Coletta PL. 2007. Human menopausal and pregnant mare serum gonadotrophins in murine superovulation regimens for transgenic applications [J]. *Theriogenology,* **67**(8): 1409-1413.

Catchpole HR, Engel MB, Jordan SL. 2003. A microprobe study of element distribution in vaginal epithelial cells of the rat [J]. *Cell Biol Int,* **27**(4): 355-359.

Chen YH, Men HS, Zhou XL, He XC. 1991. The study of bovine embryo transfer in Yunnan [J]. *Zool Res,* **12**(4): 381-385. [陈云鹤, 门红升, 周瑆良, 和协超. 1991. 云南省奶牛胚胎移植试验, 动物学研究, **12**(4): 381-385.]

Cui YR, Jin H, Du CY, Wang CY, Chen H, Zhang QX. 2012. Effecting factor's analysis of superovulation in Kunming mouse [J]. *Prog Vet Med,* **33**(2): 55-57. [崔元戎, 金辉, 杜春艳, 王纯耀, 陈辉, 张钦宪. 2012. 昆明鼠超数排卵影响因素研究. 动物医学进展, **33**(2): 55-57.]

Ding F, Zhou HL, Liu Y, Ma L, Su Y, Du L. 2007. Effects of glucose on development of ICR mouse embryos in vitro [J]. *Zool Res,* **28**(5): 501-506. [丁芳, 周红林, 刘洋, 马兰, 苏莹, 杜玲. 2007. 葡萄糖对ICR 小鼠胚胎体外发育的影响. 动物学研究, **28**(5): 501-506.]

Fortune JE. 2003. The early stages of follicular development: activation of primordial follicles and growth of preantral follicles [J]. *Anim Reprod Sci,* **78**(3-4): 135-163.

Fu WD, Sun YC, Suo L, Gao JM. 2005. Observation of estrous cycle and choice of optimal superovulation time in mice [J]. *J Beijing Agric Coll,* **20**(2): 19-21. [傅文栋, 孙玉成, 索伦, 高建明. 2005. 小鼠发情周期观察与最佳超排时期的确定. 北京农学院学报, **20**(2): 19-21.]

Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies [J]. *Birth Defects Res: Part B,* **80**(2): 84-97.

Guo QY, Jian ZJ, Liu XL, Yuan L, Kuang L. 2006. Research on influences of superovulation in different stage of estrous cycle about mouse [J]. *J Xinjiang Agric Univ,* **29**(3): 16-18. [郭庆勇, 简子健, 刘小兰, 袁龙, 况玲. 2006. 小鼠发情周期不同时期超数排卵效果的研究. 新疆农业大学学报, **29**(3): 16-18.]

He XC, Ji SH, Zhang X, He ZX, Wen JK, Ji WZ. 1999. Comparison between GnRH and PGF2α on estrus synchronization in dairy cows[J]. *Zool Res*, **20**(5): 332-335. [和协超, 纪少珲, 张僖, 和占星, 文际坤, 季维智. 1999. 奶牛胚胎移植中 GnRH、PGF2α同期发情处理效果的比较. 动物学研究, **20**(5): 332-335.]

He ZX, He XC, Luo ZR, Zhu FX, Lingmu DX, Chuang XH, Yin AQ, Huang XS. 2005. Experiments on synchronous estrus, superovulation and embryo transfer in buffaloes of Yunnan [J]. *Zool Res,* **26**(1): 106-111. [和占星, 和协超, 罗在仁, 朱芳贤, 铃木达行, 创向辉, 尹安强, 黄晓松. 2005. 云南水牛的同期发情、超数排卵和胚胎移植试验. 动物学研究, **26**(1): 106-111.]

Kopp C, Ressel V, Wigger E, Tobler I. 2006. Influence of estrus cycle and ageing on activity patterns in two inbred mouse strains [J]. *Behav Brain Res,* **167**(1): 165-174.

Martín-Coello J, González R, Crespo C, Gomendio M, Roldan ERS. 2008. Superovulation and *in vitro* oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*) [J]. *Theriogenology,* **70**(6): 1004-1013.

Nagy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. 2002. Manipulating the Mouse Embryo. 3rd ed. [M]. LongIsland: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 147.

Palermo R. 2007. Differential actions of FSH and LH during folliculogenesis [J]. *Reprod Biomed Online,* **15**(3): 326-337.

Redian OE, Amstislavsky SY, Maksimovsky LF. 1994. Induction of superovulation in DD mice at different stages of the oestrous cycle [J]. *J Reprod Fertil,* **102**(2): 263-267.

Tarín JJ, Pérez-Albalá S, Cano A. 2002. Stage of the estrous cycle at the time of pregnant mare's serum gonadotropin injection affects the quality of ovulated oocytes in the mouse [J]. *Mol Reprod Dev,* **61**(3): 398-405.

Tsiligianni T, Saratsi A, Besenfelder U, Anastasiadis A, Vainas E, Saratsis P, Brem G. 2004. The use of cytological examination of vaginal smears (CEVS) in the selection of rabbits for superovulation [J]. *Theriogenology*, **61**(6): 989-995.

Yang PX. 2007. Studies of Toxicity of Aroclor 1254 on Early Mouse Embryo Development *in Vitro* [D]. MSc thesis, Northwest A&F University. [杨培先. 2007. Aroclor 1254 对小鼠早期胚胎体外发育毒性的研究 [D]. 硕士学位论文, 西北农林科技大学.]

Zhang S, Wang X, Wei XB, Tan JH. 2006. Observation on the vaginal smear photographs for each stage of estrus cycle in rats [J]. *Prog Vet Med,* **27**(2): 69-72. [张森, 王新, 韦旭斌, 谭建华. 2006. 大鼠发情周期各阶段的阴道细胞变化观察. 动物医学进展, **27**(2): 69-72.]

动　物　学　研　究　2012，Jun. 33(3): 283−289　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03283

软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存

王晓爱[1,2]，杨君兴[1,*]，陈小勇[1,*]，潘晓赋[1]，李再云[1]

（1. 中国科学院昆明动物研究所 遗传资源与进化国家重点实验室，云南 昆明　650223；
2. 中国科学院研究生院，北京　100049）

摘要：2011 年，对软鳍新光唇鱼 (*Neolissochilus benasi*)进行了精子超低温冷冻保存研究。以解冻后的精子活力为指标，采用稀释液 D-15，设计不同的抗冻剂种类和浓度，以及不同的实验条件(包括冷冻体积、4 ℃平衡时间和解冻温度等)探索软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存方法。筛选出了适合软鳍新光唇鱼精子超低温冷冻保存的两种抗冻保护剂及其浓度分别为 10% MeOH 和 15% EG，确定了精液与稀释液的最适稀释比例为 1∶7、4 ℃平衡时间区间为 10～60 min、冷冻体积为 60 μL，以及复苏方法为 37 ℃水浴快速解冻 30 s。当鲜精活力为(62.33±2.05)%，综合以上最佳实验条件进行保存，解冻后精子的最高活力为(29.67±0.47)%，但效果不理想，不能达到广泛生产运用水平；产生这一结果，可能与异地保育物种的饲养管理有关。因此，在亲鱼培育管理中要最大限度地降低捕获诱发的压力，尽量提供适合的养殖条件。在珍稀鱼类异地保育时，繁殖用雄鱼的培育与雌鱼同等重要，是获得大量高质量仔鱼的关键。

关键词：软鳍新光唇鱼；精子；超低温冷冻保存；活力
中图分类号：Q959.468; Q954.43; Q492　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)03-0283-07

Cryopreservation of sperm from *Neolissochilus benasi*

WANG Xiao-Ai[1,2], YANG Jun-Xing[1,*], CHEN Xiao-Yong[1,*], PAN Xiao-Fu[1], LI Zai-Yun[1]

(1.*State Key Laboratory of Genetic resources and Evolution*, *Kunming Institute of Zoology*, *the Chinese Academy of Sciences*, *Kunming*　650223, *China*; 2. *Graduate School of the Chinese Academy of Sciences*, *Beijing*　100049, *China*)

Abstract: Cryopreservation of sperm from *Neolissochilus benasi* was studied in 2011. The effects of various cryoprotectants of different concentrations, dilution ratios of milt to extender, storage volume and thawing temperature on motility of post-thawing of spermatozoa were examined to optimize cryopreservation procedures. Semen was stored in liquid nitrogen in 1.8 mL cryovial for 24 h, and the intensity of sperm motility was measured before and after cryopreservation. Post-thawing motility of frozen sperm obtained with cryoprotectants 10% MeOH or 15% EG were higher than for others. The most effective dilution ratio of milt to extender is 1:7. The maximal storage volume is 60 μL of 1.8 mL cryovial and the optimal sperm equilibration period in the extender D-15+10% MeOH was between 10-60 min. Thawing was optimal in a 37 °C water bath. When fresh sperm motility is (62.33±2.05)%, this cryopreservation protocol resulted in frozen-thawed semen with 20%-30% motile. The overall effect is not ideal, and cannot achieve extensive application. Different breeding management of different ground protection may have contributed to this result. Therefore, it is necessary to reduce stress capture induced in management of parent fish and provide suitable forming conditions. In the ex situ conservation of rare fish the broodstocks management of males is as important as that for females and the key to obtaining high quality larval fish.

Key words: *Neolissochilus benasi*; Sperm; Cryopreservation; Motility

动物种质资源(精子、卵细胞和胚胎)包含了物种的全部遗传物质，而遗传物质决定了物种的多样性。种质资源亦是水产养殖生产、优良品种培育及水产养殖业可持续发展的重要物质基础。然而，由于忽视鱼类种质保护及品种选育等工作，养殖鱼类近亲交配越来越严重，造成种质退化，遗传多样性减少，病害发生日益严重，经济损失巨大(Li, 2001)。因此，培育优良水产养殖品种，保护种质及其遗传

收稿日期：2011-11-04；接受日期：2012-02-14
基金项目：云南大唐国际李仙江流域水电开发有限公司委托项目；国家电力云南阿墨江发电有限公司委托项目
*通信作者(Corresponding author)，杨君兴 E-mail: yangjx@mail.kiz.ac.cn；陈小勇 E-mail: chenxy@mail.kiz.ac.cn

多样性已成为水产养殖业中亟待解决的重要科技问题。

目前鱼类的种质细胞保存中，精液保存是重要组成部分之一(Chen, 2007)。自 20 世纪 50 年代初首次成功冷冻保存大西洋鲱(*Clupea harengus*)精巢以来(Blaxter, 1953)，世界各国学者对鱼类配子的冷冻保存进行了大量研究，从稀释液的选择(Gallant et al, 1993)、保护剂的使用浓度(Kopeika et al, 2003; Muchlisin, 2005)、不同冷冻保护剂的配合、平衡时间(He & Woods, 2003)、降温速率、解冻方式及复温速率(Tiersch et al, 2007)，到先进低温仪器设备的研制和利用等方面解决了不同生物材料的超低温冷冻保存问题(Leung & Jamieson, 1991; Li et al, 1998)。目前，已经报道了 200 余种鱼类精子冷冻保存的研究，形成了 60 余种淡、海水鱼类精液成熟的冷冻保存技术，并建设了首个淡水鲤科鱼类冷冻精子库(Chen, 2007)。

软鳍新光唇鱼(*Neolissochilus benasi*)(Pellegrin & Chevey, 1936)，旧称软鳍四须鲃 (*Barbodes benasi*)，隶属于鲤科(Cyprinidae)鲃亚科(Barbinae)新光唇鱼属(*Neolissochilus*)，有关软鳍新光唇鱼的研究主要集中在其分类地位上(Chen & Yang, 2003)，在精子冷冻方面未见有报道。随着中国境内红河水系水电的开发，对河道内多种珍稀土著鱼类产生了诸多的不利影响(Yang et al, 2011)。因此，云南大唐国际李仙江流域水电开发有限公司和国家电力云南阿墨江发电有限公司委托中国科学院昆明动物研究所开展了软鳍新光唇鱼、异鱲(*Parazacco spilurus*)、越鳠(*Mystus pluriradiatus*)和暗色唇鱼(*Semilabeo obscurus*)的人工增殖放流研究(Yang et al, 2010; Yang et al, 2011)。在长期的塘养环境下，塘养种群会发生遗传适应性变化，从而导致放流的鱼类个体相对野生个体具有更低的繁殖成功率(Fleming & Gross, 1993)；而很多的研究报道将造成这一结果的原因归结于环境的改变，而这种环境改变对塘养环境下雌鱼所产鱼卵质量造成的影响更能引起人们的广泛关注(Pan et al, 2009)。在鱼类塘养种群遗传管理实践中，精子低温和超低温冷冻保存能有效地“延长”繁殖个体的繁殖寿命，并在塘养种群的世代数最小化方面显示出很广泛的应用潜力，但该技术仅在一小部分动物物种中使用（Frankham et al, 2002）。目前，鲜见对塘养环境下，异地保育鱼类雄鱼精液品质检测的报道。本研究旨在通过借鉴其他鱼类精子的冷冻保存操作规程，探索不同抗冻剂及其浓度、稀释比例、冷冻体积和降温速率等对软鳍新光唇鱼精子冷冻保存的影响，确定超低温冷冻保存的最适条件，监测异地保育雄鱼精子品质的变化，最终达到保存软鳍新光唇鱼种质资源的目的。

1 材料与方法

1.1 材料选取与处理

1.1.1 亲本的来源与饲养方案 实验用的雄鱼系 2008 年 5 月采集自云南李仙江流域，饲养在中国科学院昆明动物研究所珍稀鱼类保育研究基地。养殖池塘面积以 100～200 m^2、水深以 1.0～1.5 m 为宜。软鳍新光唇鱼养殖密度通常要低(<3 kg/m^3)，雌雄比 1∶1.5。水温在 16～25 ℃之间, 10 月到第二年 3 月光周期(光照：黑暗为 10 h∶14 h) 3 一 9 月(12 h∶12 h)。软鳍新光唇鱼是杂食性鱼类使用的饲料为 111 鲤鱼种鱼饲料(颗粒直径=2.0 mm，通威股份有限公司昆明分公司)。一天投喂两次，上午和下午各一次。日粮为亲鱼体重的 3%左右，每次的投喂量以 15～30 min 吃完为度。

1.1.2 精液收集与超低温冷冻 精液收集方法：随机选取 24 尾性腺成熟的雄鱼[体长(173.0±16.3) mm，体重(89.58±21.5) g]捞出水池，用 100×10^{-6} 的 MS-222 (Tricaine, $C_{10}H_{15}NO_3S$)麻醉 5 min，鱼类腹部用毛巾擦干，然后轻轻挤压腹部，成熟的精液自然流出到 1.5 mL 离心管中。

精液超低温冷冻方法：选取 24 尾雄鱼[精子密度为$(17.50\pm2.47)\times10^9$ 个/mL，鲜精的平均活力为(62.33±2.05)%，经检验，个体间鲜精活力差异不显著]个体的精液，混合后用含抗冻保护剂的稀释液，D-15(0.8% NaCl、0.05% KCl、1.5% Glucose)(Chen et al, 1992)稀释成相应比例，以一定体积装入 1.8 mL 冻存管中，4 ℃平衡一段时间，然后将冻存管在液氮面上 6 cm 放置 2 min，液氮面上放置 2 min，然后投入液氮中(Chen, 2007)。24 h 后，取出液氮中的样品，一定温度水浴解冻 30 s。

1.2 实验方法

1.2.1 不同抗冻剂及浓度对精子冷冻的影响 选取抗冻剂二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、甘油(Glycerol)、乙二醇(Ethylene glycol, EG)和甲醇(MeOH) 等 4 种，浓度梯度分别为 5%、10%和 15%，实验选用的稀释比例(精液体积：稀释液体积)为 1∶7,

冻存体积为 20 μL, 4 ℃平衡 40 min 后, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37 ℃水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.2　稀释比例对精子冷冻的影响　稀释比例(精液体积：稀释液体积)设为 1∶1、1∶2、1∶3、1∶4、1∶5、1∶7 和 1∶9 等 7 个梯度, 抗冻剂为 10% MeOH, 冻存体积为 20 μL, 4 ℃平衡 40 min 后, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37 ℃水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.3　冻存管冻存体积对精子冷冻的影响　冻存体积设为 10、15、20、30、40、50、60、80 和 100 μL 等 9 个梯度, 抗冻剂为 10% MeOH, 稀释比例为 1:7, 4 ℃平衡 40 min 后, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37 ℃水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.4　4 ℃平衡时间对精子冷冻保存的影响　4 ℃平衡时间设为 0、5、10、20、40、60、90、120 min 8 个梯度, 稀释液为 D-15+10% MeOH, 稀释比例为 1∶7, 冻存体积为 20 μL, 4 ℃平衡 40 min 后, 三步法液氮, 保存 24 h 后, 37 ℃水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.2.5　复苏温度对精子冷冻的影响　复苏温度选择 28、32、37 和 40 ℃等 4 个梯度, 本实验采用的稀释液为 D-15+10% MeOH, 稀释比例为 1∶7, 冻存体积为 20 μL, 4℃平衡 40 min, 三步法入液氮, 保存 24 h 后, 37 ℃水浴解冻 30 s, 检测冻精活力。

1.3　数据处理

精子密度(sperm density)：用稀释液将精液稀释 200 倍后, 用血球计数板计数精子数量, 再计算出精子密度(Rakitin et al, 1999)。

精子活力(sperm motility)：用淡水激活精子后立即在显微镜下观察运动精子占全部精子的百分数(Mana, 1964; Mounib, 1978)。

先用方差分析(ANOVA)测验每个实验的总体各组之间差异是否显著。若显著, 再用 LSD 多重比较检验处理组之间差异显著性。数据表示均为 mean±SD。

2　结　果

2.1　抗冻剂及浓度对精子活力的影响

不同抗冻剂及浓度保存的精子复苏后精子活力均低于鲜精(图 1, n=24), 在几种抗冻剂及浓度的组合中, 10% MeOH 和 15% EG 效果最好, 解冻后精子活力最高, 分别为(27.67±2.05)%和(24.33±3.30)%; 两者间无显著差异(P>0.05), 但这两种处理方式与其他的处理方式均有显著差异(P<0.01)。

DMSO 和 Grycerol 为抗冻剂时, 随着浓度的增加, 冻精活力则降低, 而 EG 为抗冻剂时, 随着浓度的递增, 冻精活力随之增高, MeOH 为抗冻剂时, 在浓度为 10%时出现冻精活力的最大值。

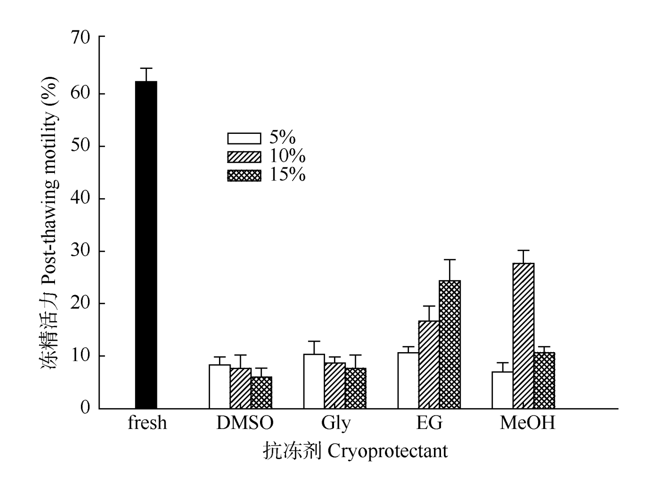


图 1　抗冻剂及其浓度对精子活力的影响

Fig. 1　The effect of cryoprotectants of different concentrations on sperm motility (n=24, mean±SD) when refrigerated

2.2　稀释比例对精子活力的影响

精液量和稀释液配比对精子冻存的影响(图 2, n=24)结果显示, 在稀释比例为 1:7 时, 解冻后的精子活力最高, 为 (19.67±1.25)%。稀释比例 1∶4(17.67±2.05)%、1∶5(18.00±1.63)%和 1∶7 间无显著差异(P>0.05), 三者与其他各组间均差异显著。

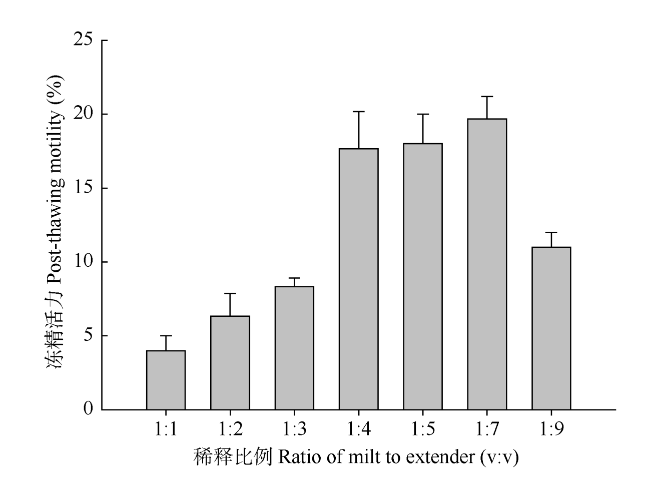


图 2　稀释比例对精子活力的影响

Fig. 2　The effect of different dilution ratios of milt to extender on sperm motility (n=24, mean±SD) when refrigerated

2.3 冻存体积对精子活力的影响

冻存管中保存的精液体积不同，解冻后精子活力有差异(图 3, n=24)，冻存体积为 60 μL 时，解冻后精子活力最高，为(29.67±0.47)%，且 60 μL 与 20 μL(27.33±0.94)%、30 μL(27.33±1.89)%、40 μL(28.00±1.63)%、50 μL(29.33±2.62)%、80 μL(28.33±1.25)%之间无显著差异。冻存体积为 10、15 和 100 μL 时，解冻后精子活力都较低，分别为(9.00±1.41)%、(10.67±1.70)%和(15.67±2.33)%。

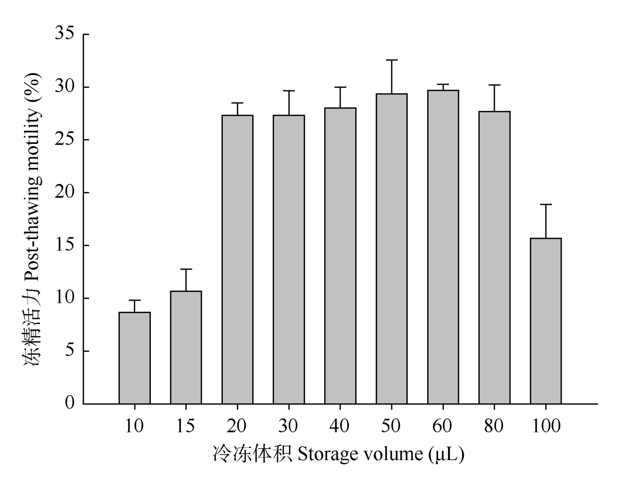


图 3 冷冻体积对精子活力的影响

Fig. 3 The effect of different storage volumes on sperm motility(n=24, mean±SD) when refrigerated

2.4 4 ℃平衡时间对冷冻后精子活力的影响

4 ℃不同平衡时间，解冻后精子活力结果显示(图 4, n=24)，平衡时间在 10～60 min 间，冻精平均活力均大于 20.0%；平衡时间 40 min 时，冻精活力最大为(25.20±2.20)%；平衡时间 5 min 与 90 min 间、10 min 与 60 min 间、20 min 与 60 min 间无显著差异，平衡时间 0 min 与 120 min 间、5 min 与 60 min 间和 10 min 与 20 min 间差异显著，其它各组间差异极显著。

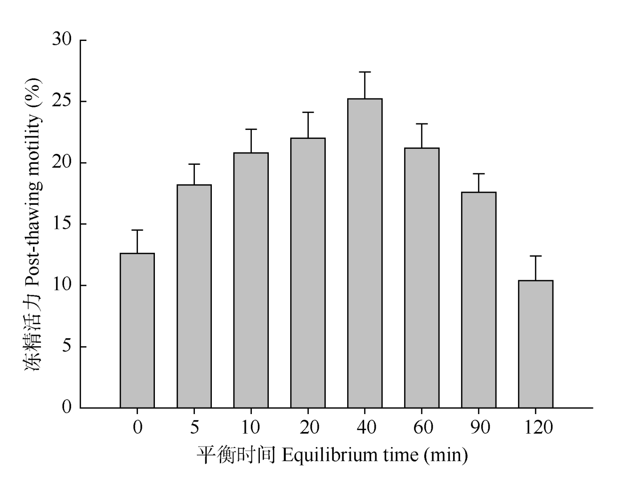


图 4 4 ℃平衡时间对精子活力的影响

Fig. 4 The effect of different 4 ℃ equilibrium time on sperm motility (n=24, mean±SD) when refrigerated

2.5 复苏温度对精子活力的影响

复苏温度对解冻后精子活力的影响(图 5, n=24)，结果显示：当复苏温度为 37 ℃时，复苏后的精子活力最高，为(22.80±2.49)%，其次是 40 ℃，精子活力为(21.60±2.91)%，两者间无显著差异(P>0.05)，28 ℃(17.00±2.16)%和 32℃(17.33±1.70)%组，差异亦不显著，其余各组差异极显著。

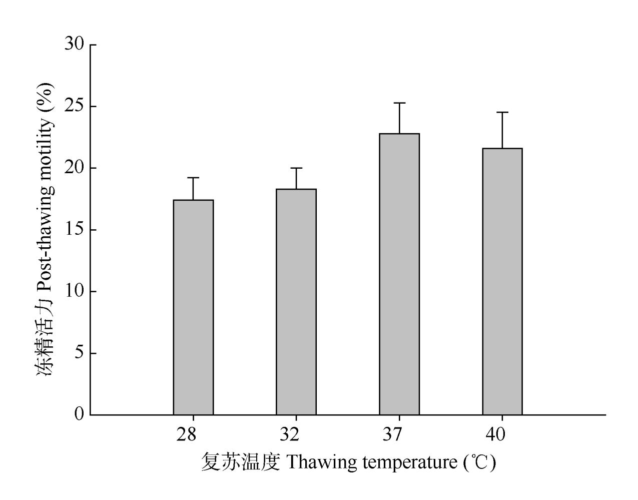


图 5 复苏温度对精子活力的影响

Fig. 5 The effect of different thawing temperatures on sperm motility (n=24, mean±SD) when refrigerated

3 分析与讨论

3.1 稀释液对精子活力的影响

Chen et al (1992)对我国主要淡水鲤科养殖鱼类草、鲢、鳙和团头鲂等鱼类精液冷冻保存技术进行了深入系统地研究，研制出理想的稀释液配方，即 D-15，获得冷冻精子活力高达 70%、受精率高达 94%和孵化率高达 92%的结果，达到了生产应用水平。因此，本研究中选择 D-15 作为软鳍新光唇鱼精子冷冻的稀释液，但效果不理想，不能达到生产运用水平；产生这一原因，可能与异地保育的饲养管理有关。由于实验用软鳍新光唇鱼鲜精的平均活力为 (62.33±2.05)%，较鲤 (*Cyprinus carpio*)、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*) 和草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)(Chen et al, 1992)的鲜精活力低，加上所用鱼类采自野外，经过短暂的池塘饲养，还未建立系统的亲鱼培育技术体系。因此，在亲鱼培育管理中要最大限度地降低捕获诱发的压力，尽量提供适合的养殖条件。

抗冻保护剂的种类和浓度是影响一些敏感细胞(如精子等)超低温冷冻保存的重要因素。由于不同种类的鱼类精子的生理特性具有很大差异。因此，确定最适的抗冻剂种类和浓度非常重要。DMSO、Glycerol、EG 和 MeOH 是较为常见的 4 种渗透性抗冻剂。DMSO 因其高渗透性和易与精子膜上磷脂层发生相互作用而被广泛应用于多种鱼类精子冷冻(Cabrita et al, 2010), Glycerol 主要用于海水鱼类精子冷冻保存(Zhang et al, 2003), EG 和 MeOH 应用于少数水生生物精子冷冻也取得了较好的抗冻效果(Harvey et al, 1982; Horvath et al, 2008)。因抗冻剂的毒性会随着其浓度升高而增强(Ye et al, 2009), 因此，所用抗冻剂浓度一般不会超过 15%(Lahnsteiner & Mansour, 2008), 故本研究中抗冻剂的浓度最高为 15%。随着 DMSO 和 Glycerol 浓度的增加，软鳍新光唇鱼冻精活力呈下降趋势，且各种浓度下，冻精活力均在较低水平，而 MeOH 在浓度为 10%时出现最大值，这与北极嘉鱼和淡水鳕两种淡水鱼类的精子冷冻结果相似(Mansour et al, 2006; Lahnsteiner & Mansour, 2008), 可能是在平衡时间为 40 min 的前提下，10%这个浓度既能使 MeOH 渗入细胞起到保护作用，毒性又不会太高。对于 EG, 随着浓度增高，冻存效果越好，当浓度达到 15%时，冻存效果最佳。

精液获取之后，需要采用稀释液稀释以获得实验所用的大量精液，然而在牡蛎、鱼类和哺乳动物精液稀释过程中，稀释倍数太大会导致精子活力下降(Paniagua et al, 1998)。因此，最适的稀释比例也是影响冻精活力的一个重要因素。对于多数淡水鱼类，其精液与稀释液的最佳稀释比例在 1∶2 与 1∶10 之间(Tiersch, 2007; Cabrita et al, 2010)。软鳍新光唇鱼精子冷冻的最适稀释比例 1∶7 亦在此范围内。

3.2　冷冻体积与平衡时间对精子活力的影响

冻存管冷冻法具有经济、降温速率易于控制、操作简单、快速和装精容量大等优点(Chen et al, 1987), 而冷冻体积对精子冷冻的影响主要通过降温速率和解冻条件来实现(Ritar & Campet, 2000)。软鳍新光唇鱼精子冷冻体积在 20～80 μL 区间内，解冻后精子活力无显著差异，说明在三步降温法和 37 ℃水浴解冻 30 s 的情况下，冷冻体积不是影响软鳍新光唇鱼冻精活力的重要因素。

冷冻前，为了让渗透性抗冻剂渗入精子起到保护作用所用的时间就是平衡时间，平衡温度一般在 4～15 ℃间，温度低有利于减小抗冻剂对精子的毒性，温度高则能够提高抗冻剂渗入速率(Lahnsteiner et al, 2000)。对于不同的渗透性抗冻剂及浓度，因其渗透性和对精子毒性的不同，平衡时间亦不同，一般鱼类精子的平衡时间多控制在 10～20 min (Billard, 2001)。4 ℃平衡时间在 10～60 min 间，软鳍新光唇鱼冻精活力无显著差异，说明对软鳍新光唇鱼的精子而言，抗冻剂为 10% MeOH 时，平衡时间不是影响冻精活力的重要因素。

3.3　解冻速度对精子活力的影响

解冻是冷冻降温的逆步骤，冷冻降温中出现的一些冷冻损伤效应在解冻复温中同样存在，因此，快速解冻以度过损伤敏感区是必要的(Li et al, 1998)。鱼类冷冻精液的解冻速度和解冻效果之间的关系在不同种类中有所差别，鲤科鱼类所报道的解冻温度区间为 20～50 ℃，比较常用的是 30～40 ℃水浴，冻存管解冻时间在 20～45 s 间(Lahnsteiner et al, 2000), 而麦管解冻时间一般是 10 s 左右，如剑尾鱼的最适解冻方法为 40 ℃、7 s(Dong et al, 2008)。本研究结果表明水浴 37 ℃，冻精活力最高，效果最佳，但与 40 ℃间并无显著差异，可能是因为解冻时间都为 30 s，足以让其充分解冻又不至于温度过高而影响精子活力。

3.4　精子超低温冷冻效果评价

精子在冷冻过程中，冷冻损伤造成部分精子头部和尾部的质膜破裂，细胞死亡(Zhao et al, 1992), 使冷冻精子内异柠檬酸脱氢酶、苹果酸脱氢酶、激酶及 ATP 酶的含量明显低于鲜精(Maisse, 1994)。因此，冷冻精液的活力与质量很难达到鲜精的水平。即使鲜精活力差异不显著，不同物种间解冻后精子活力仍存在差异，三种鱼类模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)、青鳉(*Oryzias latipes*)和剑尾鱼(*Xiphophorus hellerii*)解冻后精子活力差异显著(Yang & Tiersch, 2009)，在斑马鱼中，不同个体间在鲜精活力(91±3)%无显著差异的前提下，解冻后精子活力却差异显著，在 10%～60%区间内变动，受精率在 0%～18%区间内变化(Yang et al, 2007), 且精子活力与受精率间不一定存在相关性(He & Woods, 2004)，所以相对较低的冻精活力并不意味着低的受精率，这一点将在以后对软鳍新光唇鱼的研究中阐述。

4　结　论

对于软鳍新光唇鱼精子的超低温冷冻保存，本

研究以冻精活力为指标，采用D-15为稀释液，所得的最佳冷冻保存方案为：抗冻剂为 10% MeOH 或 15% EG，精液与稀释液的稀释比例为1∶7, 4 ℃平衡时间区间为 10～60 min，冻存管冻存体积为 60 μL，解冻方法为 37 ℃水浴 30 s 快速解冻。以后的研究将增加更多指标，如膜完整率、受精率和孵化率等，探索更多因素，如渗透压、离子浓度对精子冷冻的影响，以改善软鳍新光唇鱼精子的冷冻保存技术，以期达到应用水平。

致谢：中国科学院昆明动物研究所生殖生物学组的司维和王鑫轶在实验操作中给予悉心指导，珍稀鱼类保育基地的杨世论、倪仰居、施丛永和施茂在实验过程中给予诸多帮助，在此一并表示感谢！

参考文献：

Billard R, Zhang T. 2001.Techniques of genetic resource banking in fish [M] // Walson PF, Holt WV. Cryobanking the Genetic Resource Wildlife Conservation for the Future. NewYork: Yaylor & Franeis, 143-170.

Blaxter THS. 1953. Sperm storage and cross-fertilization of spring and autumn spawning herring[J]. *Nature*, **172**(4391): 1189-1190.

Cabrita E, Sarasquete C, Martínez-Páramo S, Robles V, Beirão J, Pérez-Cerezales S, Herráez MP. 2010. Cryopreservation of fish sperm: applications and perspectives[J]. *J Appl Ichthyol,* **26**(5): 623-635.

Chen SL, Liu XT, Lu DC, Zhang LZ, Fu CJ, Fang JP. 1992. Cryopreservation of spermatozoa of siler carp, comon carp, blunt snout bream and grass carp[J]. *Acta Zool Sin*, **38**(4): 413-424. [陈松林，刘宪亭，鲁大椿，章龙珍，傅朝君，方建平. 1992. 鲢、鲤、团头鲂和草鱼精液冷冻保存的研究. 动物学报, **38**(4): 413-424.]

Chen SL, Zhang LZ, Guo F. 1987. The research of DMSO effects of Chinese carp[J]. *Freshwat Fish*, **17**(5):17-20.[陈松林，章龙珍，郭峰. 1987. 抗冻剂二甲亚砜家鱼精子生理特性影响的初步研究. 淡水渔业, **17**(5): 17-20]

Chen SL. 2002. Progress and prospect of cryopreservation of fish gametes and embryos[J]. *J Fish Chn*, **26**(2): 161-168. [陈松林. 2002. 鱼类配子和胚胎冷冻保存研究进展及前景展望. 水产学报, **26**(2): 161-168.]

Chen SL. 2007. Theory and Techniques of Fish Spermatozoa and Embryos Cryopreservation[M]. Beijing: China Agriculture Press. [陈松林. 2007. 鱼类精子和胚胎冷冻保存理论与技术[M]. 北京：中国农业出版社]

Chen XY, Yang JX. 2003. A systematic revision of "*Barbodes*" fishes in China[J]. *Zool Res*, **24**(5): 377-386.

Dong Q, Huang C, Hazlewood L, Walter R.B, Tiersch TR. 2008. Sperm cryopreservation for live-bearing fishes of the genus *Xiphophorus* [M] //Cabrita E, Vanesa R, Herraez P. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species: Biology series. London: CRC Press, 339-344.

Fleming IA, Gross MR. 1993. Breeding success of hatchery and wild coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) in competition[J]. *Ecol Appl*, **3**(2): 230-245.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA. 2002. Introduction to Conservation Geneties[M]. 2nd Ed. Cambridge UK: Cambridge University Press, 1-618.

Gallant RK, Richardson GF, McNiven MA . 1993. Comparison of different extenders for the cryopreservation of atlantic salmon spermatozoa[J]. *Theriogenology*, **40**(3): 479-486.

Harvey B, Kelley NR, Ashwood-Smith MJ. 1982. Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol[J]. *Can J Zool,* **60**(8): 1867-1870.

He SY, Woods LC. 2003. The effects of osmolality, cryoprotectant and equilibration time on striped bass *Morone saxatilis* sperm motility[J]. *J World Aquacult Soc*, **34**(3): 255-265.

He SY, Woods LC. 2004. Effects of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitochondria to striped bass (*Morone saxatilis*) sperm. *Cryobiology*, **48**(3): 254-262.

Horvath A, Wayman WR, Dean JC, Urbányi B, Tiersch TR, Mims SD, Johnson D, Jenkins JA. 2008. Viability and fertilizing capacity of cryopreserved sperm from three North American acipenseriform species: a retrospective study[J]. *J Appl Ichthyol*, **24**(4): 443-449.

Kopeika J, Kopeika E, Zhang T, Rawson DM. 2003. Studies on the toxicity of dimethyl sulfoxide, ethylene glycol, methanol and glycerol to loach (*Misgurnus fossilis*) sperm and the effect on subsequent embryo development[J]. *Cryoletters*, **24**(6): 365-374.

Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbanyi B, Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes[J]. *Theriogenology*, **54**(9): 1477-1498.

Lahnsteiner F, Mansour N. 2008. Protocols for the cryopreservation of Salmonidae semen, *Lota lota* (Gadidae) and *Esox lucius* (Esocidae) Northerpike (Livro)[M]//Cabrita E, Robles V, Herraez MP. Methods in Reproductive Aquaculture: Marine and Freshwater Species: Biology series. London: CRC Press (Taylor and Francis group), 373–384.

Leung LKP, Jamieson BGM. 1991. Live preservation of fish gametes [M] //Jamieson BGM. Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. London: Cambridge University Press, 245–269

Li GW, Zheng CY, Tang B. 1998. Cryobiology. Changsha: Hunan: Science and Technology Press. [李广武，郑从义，唐 兵. 1998. 低温生物学. 长沙：湖南科学技术出版社]

Li SF. 2001. A Study on Biodiversity and its Conservation of Major Fishes in the Yangtze River [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1-170. [李思发. 2001. 长江重要鱼类生物多样性和保护研究[M]. 上海：上海科学技术出版社, 1-170.]

Maisse G. 1994. Comparison of different carbohydrates for the cryopreservation of Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) sperm. *Aquat Living Resour*, **7**(3): 217-219.

Mann T. 1964. The Biochemistry of Semen and of the Male Reproductive Tract[M]. 2nd Ed. Methuen, London: Wiley, 493.

Mansour N, Richardson GF, McNiven MA. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of *Arctic char*, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa[J]. *Aquac Res*, **37**(9), 862–868.

Mounib M. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa[J]. *Reproduction*, **53**(1): 13.

Muchlisin ZA. 2005. Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation[J]. *Biodiversitas*, **6**(1): 66-69.

Pan XF, Liu SW, Li ZY, Yang JX. 2009. Artificial propagation and larvae cultivation of *Sinocyclocheilus tingi*[J]. *Zool Res*, **30**(4): 463-467. [潘晓赋，刘淑伟，李再云，杨君兴. 2009. 抚仙金线鲃人工繁殖与鱼苗培育技术. 动物学研究, **30**(4): 463-467]

Paniagua-Chavez CG, Buchanan JT, Tiersch TR. 1998. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of Eastern

oyster sperm[J]. *J Shellfish Res*, **17(1-3)**: 231-237

Rakitin A, Ferguson MM, Trippel EA. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season[J]. *Aquaculture*, **170**(3-4): 349-358.

Ritar AJ, Campet M. 2000. Sperm survival during short-term storage and after cryopreservation of semen from striped trumpeter (*Latris lineata*)[J]. *Theriogenology*, **54**(3): 467-480.

Stoss J, Holtz W. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm: 4. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution[J]. *Aquaculture*, **32**(3-4): 321-330.

Suquet M, Dreanno C, Fauvel C, Cosson J, Billard R. 2000. Cryopreservation of sperm in marine fish[J]. *Aquac Res*, **31**(3): 231-243.

Tiersch T, Yang H, Jenkins JA, Dong Q. 2007. Sperm cryopreservation in fish and shellfish[J]. *Soc Reprod Fertil Suppl*, **65** (supp): 493–508.

Yang J, Pan XF, Chen XY, Yang JX. 2010. Status and conservation strategy of fish resources in Lixianjiang river[J]. *J Hydroecol*, **3**(2): 54-60. [杨剑, 潘晓赋, 陈小勇, 杨君兴. 2010. 李仙江鱼类资源的现状与保护对策. 水生态学杂志, **3**(2): 54-60.]

Yang HP, Carie J, Varga ZM, Tiersch TR. 2007. Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*[J]. *Theriogenology*, **68**(2): 128-136.

Yang HP, Tiersch TR. 2009. Current status of sperm cryopreservation in biomedical research fish models: zebrafish, medaka, and *Xiphophorus*[J]. *Comp Biochem Physiol C*: *Toxicol Pharmacol*, **149**(2): 224-232.

Yang YH, Yang JX, Pan XF, Zhou W, Yang ML. 2011. Fishery resource protection by artificial propagation in hydroelectric development: Lixianjiang River drainage in Yunnan as an example[J]. *Zool Res,* **32**(2): 188-195.[杨永宏, 杨君兴, 潘晓赋, 周　伟, 杨美临. 2011. 云南李仙江流域水电开发中的鱼类资源保护. 动物学研究, **32**(2): 188-195.]

Ye T, Zhu JQ, Yang WX, Wei P, Wu XF. 2009. Sperm cryopreservation in sparus macrocephalus and DNA damage detection with SCGE[J]. *Zool Res,* **30**(2): 151-157. [叶　霆, 竺俊全, 杨万喜, 魏　平,吴雄飞. 2009. 黑鲷精子的超低温冻存及 DNA 损伤的 SCGE 检测. 动物学研究, **30**(2): 151-157.]

Zhang YZ, Zhang SC, Liu XZ, Xu YY, Wang CL, Sawant MS, Li J, Chen SL. 2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology[J]. *Theriogenology*, **60**(5): 989-996.

Zhao WX, Jiang RL, Liu XY. Zhou SZ.1992. A study on scanning electron microscope of several carp sperm and embryo freezing damage[J]. *Freshwat Fish* **22**(5): 3-5. [赵维信, 姜仁良, 刘修英, 周士中. 1992. 几种鲤科鱼类精子和胚胎冷冻损伤的扫描电镜研究. 淡水渔业, **22**(5): 3-5.]

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 290−297 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03290

腹侧黄斑小鼠的部分特征及其突变基因的染色体定位

施美莲[1], 徐 平[1,*], 殷筱舒[2], 杨伟伟[2], 顾美儿[2], 俞利平[2], 刘桂杰[2], 吴宝金[2,*]

(1. 上海斯莱克实验动物有限责任公司, 上海 201615; 2. 杭州师范大学 实验动物中心, 浙江 杭州 310036)

摘要：腹侧黄斑小鼠(VY^{Slac})是在B_6小鼠繁殖生产过程中被发现、分离的突变系小鼠, 呈单基因显性遗传, 其头颈及躯干的腹侧为黄色。VY^{Slac}腹部表皮多巴(+)黑色素细胞及毛囊内黑色素较其背景品系B_6少; 腹部毛发颜色浅黄、多数无黑色素沉积, 但结构正常。通过微卫星标记与48只F_2小鼠($VY^{Slac}D_2F_1$回交D_2)的连锁分析发现, 突变基因与*D2Mit229*间的LOD值为5.79, 确定连锁。随后, 在突变基因附近反复多次筛选新的微卫星或SNP标记, 通过对196例F_2小鼠的多次连锁分析, 将突变基因所在区域缩小到*rs13476833*(距着丝粒 149 804 749 bp)与*rs27310903*(距着丝粒155 060 764 bp)间约5 256 015 bp的范围内。

关键词：腹部黄斑小鼠; 表型分析; 基因定位
中图分类号：Q959.837; R-332; Q344；Q954.4 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0290-08

Phenotype analysis and mutant gene location of ventral yellow mouse (VY^{Slac})

SHI Mei-Lian[1], XU Ping[1,*], YIN Xiao-Shu[2], YANG Wei-Wei[2], GU Mei-Er[2], YU LI-Ping[2], LIU Gui-Jie[2], WU Bao-Jin[2,*]

(1. *Shanghai SLAC Laboratory Animal Co*., *Ltd*., *Shanghai* 201615，*China*; 2. *Laboratory of Experimental Animal Science*, *Hangzhou Normal University*, *Hangzhou* 310036，*China*)

Abstract: The ventri-yellow pigmentation mouse (temporarily named VY^{Slac}) arose spontaneously in the C57BL/6J inbred mouse strain, found and bred by Shanghai SLAC Laboratory Animal Co., Ltd. VY^{Slac} presented a special phenotype marked by yellow coat on the ventral surface of neck and trunk that was without melanin deposition but maintained a normal structure. The number of melanocytes in epidermis and melanin in hair follicle of the abdominal skin of the mutant mouse were less than that of their background strain, while there was no significant difference between the dorsal skins of the two strains. This mutant phenotype was inherited as single-gene dominant inheritance, confirmed by genetic experiment, and there was no significant difference between VY^{Slac} and B_6 for other biological parameters such as weight, anatomic and histological structures of major organs and blood physiology. When the linkage relationship between the genomic DNA samples of F_2 48 mice ($VY^{Slac}D_2F_1 \times D_2$) and mutant phenotype were evaluated, the mutant gene was confirmed on chromosome 2 near *D2Mit229*. New microsatellite and SNP markers were selected to amplify genomic DNA samples of 196 F_2 mice and the mutant gene was narrowed down to 5.3 Mb region between *rs13476833* and *rs27310903* on chromosome 2. The preliminary results of our phenotype analysis and gene location provides a solid basis for further identification of this mutant gene.

Key words: Ventral yellow mouse(VY^{Slac}); Phenotyping; Mapping

“表型驱动”策略是后基因组时代小鼠功能基因研究基本手段之一。研究者通常针对具有特殊表型的突变系动物, 通过遗传学手段定位、鉴定突变动物特殊表型的遗传基础, 进而推知突变基因的功能(Balling, 2001; Caspary, 2010; Stottmann & Beier, 2010)。从实验动物遗传学角度来说, 带有突变基因

收稿日期：2011-11-21；接受日期：2012-04-09
基金项目：上海市科学技术委员会科研计划项目(10140902700); 国家自然科学基金项目(31071092)
*通信作者(Corresponding authors)，徐平(1964 一), 男, 研究员, 主要研究方向：实验动物育种保种、疾病模型等, E-mail:xuping@slaccas.com。
吴宝金(1969 一), 男, 教授, 主要研究方向：分子遗传学与人类疾病动物模型, E-mail:baojinwu@163.com
第一作者简介：施美莲, 高级畜牧师, E-mail: mlshi@slaccas.com

的突变系小鼠通常是在已经建立的近交系中，由一次突变建立起来的。突变系小鼠与背景品系之间表型上的差异正是由一个或少数几个突变基因的差别导致的，代表了相关突变基因的功能(Wu et al, 2009, 2010)。众多的突变系小鼠不仅仅是功能基因研究的好材料，也是人类疾病模型开发的资源库，而发现、培育具有特定表型的突变系小鼠是相关工作的基础(Morgan et al, 2010; Wilkinson et al, 2010)。腹侧黄斑小鼠为中科院上海实验动物中心工作人员在 C57BL/6J 小鼠(简称 B_6)正常生产繁殖过程中发现并分离的新的突变系小鼠。该小鼠是一种非常罕见的突变表型，表现为头颈躯干的腹侧面均为黄色。本实验对黄斑突变系小鼠的部分生物学特征包括皮肤不同部位的黑色素细胞及毛发进行了详细观察，并采用遗传学手段将突变基因定位到第 2 号染色体。本文通过细致的表型分析结合对突变基因的定位鉴定，为建立相应的人类疾病模型或功能基因研究材料打下良好的基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物及饲养环境

腹侧黄斑小鼠，雌鼠 40 只，雄鼠 40 只；成年 DBA/2(简称 D_2)雌鼠 40 只，雄鼠 40 只。BALB/c 小鼠 3 只，用于毛发及皮肤结构对照。实验小鼠均为清洁级，由杭州师范大学实验动物中心提供，实验动物生产许可证：SCXK(浙)2011-0048，实验动物使用许可证：SCXK(浙)2011-0157。动物饲养在屏障动物房内，温度控制在(23±2) ℃，湿度控制在(55±5)%，饲料采用 Co_{60}照射，自由采食和饮水，定期更换笼具、垫料(均经高温消毒)，室内照明采用 12/12 h 明暗交替。

1.2 皮肤切片的多巴染色、毛发镜检及主要脏器的组织病理学研究

取 7 日龄腹侧黄斑小鼠、B_6 小鼠和 BALB/c 小鼠的背部及腹部约 1.5 cm×0.5 cm 大小皮片，按照文献所介绍多巴染色步骤进行切片、染色、观察(Gong & Zhan, 1994)。取 2 月龄腹侧黄斑小鼠和 B_6 两种小鼠背部及腹部的被毛，经二甲苯湿润后摊片、中性树胶封固，光镜下观察。取 2 月龄腹侧黄斑小鼠和 B_6 小鼠，解剖观察大体结构，并取脑、心、肝、脾、肺、肾、胸腺、肾上腺、睾丸附睾、子宫卵巢等脏器组织，常规制作石蜡切片、染色镜检。

1.3 血液生理指标测定

取 2 月龄腹侧黄斑小鼠和 B_6 小鼠雌雄各 10 只，眼眶后静脉窦采血约 300 μL，置于加有抗凝剂的指形管中，混合均匀。经血液分析仪 (美国 HEMAVET，型号：950) 进行血常规检测。

1.4 遗传标记选择与定位用标本的准备

选用本实验室建立的 39 个微卫星体系作为全基因组扫描的标记(Wu et al, 2003b)，这些微卫星分布于小鼠基因组的 19 条常染色体，在同一染色体上的遗传距离在 30～55 cM 之间，并且在 B_6 及 D_2 小鼠之间的差异至少在 4 bp 以上。

将腹侧黄斑小鼠与 D_2 小鼠配种得到具有突变表型的 F_1 代小鼠，再将 F_1 代小鼠回交 D_2 亲本品系得到 F_2 代小鼠，逐个区分 F_2 代个体是否具有突变表型；剪取 F_2 每个个体的 0.3 cm 尾尖，采用蛋白酶 K 消化、酚氯仿法提取基因组 DNA 备用。

1.5 PCR 扩增及连锁分析定位突变基因

PCR 扩增体系及扩增条件，依据文献(Wu et al, 2003b)进行，扩增样品经 50 V 电压电泳 1～2 h，电泳结束后，在紫外灯下观察并记录结果。根据记录的凝胶电泳结果分析突变表型与多态微卫星的关系(连锁或重组)。采用计算“优势对数值(LODS)”方法将突变基因定位于小鼠的某一对染色体上(Wu et al, 2003b)。

1.6 突变基因的精细定位

在初步定位的基础上，在突变基因所在染色体的局部，逐步筛选更高密度的微卫星标记（http://www. informatics.jax.org/searches/polymorphism_form.shtml)，当没有可以选择的微卫星标记以后，在 MGI 数据库中筛选 SNP 标记(Mouse Genome Informatics: http://www.informatics.jax.org/javawi2/ servlet/WIFetch?page=snpQF)，采用 PCR 产物直接测序的方法识别 SNP 标记的多态性，同时利用更多的 F_2 小鼠进行连锁分析，将突变基因所在区域进一步缩小。测序工作委托上海生工生物工程有限公司完成。

1.7 突变小鼠遗传模式的确定及数据分析方法

将腹侧黄斑小鼠与同品系小鼠配种，观察记录突变表型在后代小鼠中出现的数目及比例，将其与单基因显性及单基因隐性等遗传模式的理论值进行卡方检验。所有统计学处理在 SPSS11.0 及 Excel 2003 软件中完成。两组以上样本的均数比较用 One Way ANOVA 分析，用 Newman-Keuls 法处理组间均

数的两两比较。

2 结 果

2.1 腹侧黄斑小鼠遗传模式的确定及部分表型特征

腹侧黄斑小鼠已传 7 代, 黄斑表型稳定, 表现为头颈躯干腹侧面(从下颌至肛门)被覆黄色被毛, 黄色区域的边缘与正常被毛在腹侧与背侧交界区界线清楚, 黄色小鼠前后肢肢端颜色浅淡发白(图 1)。我们将腹侧黄斑小鼠与 B_6 配种, 得到的 152 只后代中出现亲代突变表型小鼠 78 只, 且后代中未出现与亲代不同的新表型, 将其与单基因显性遗传模式比较得到的卡方值及 P 值分别为 χ^2=0.053, P>0.75(P=0.819), 确认突变基因的遗传模式为单基因显性遗传, 外显率为 100%。

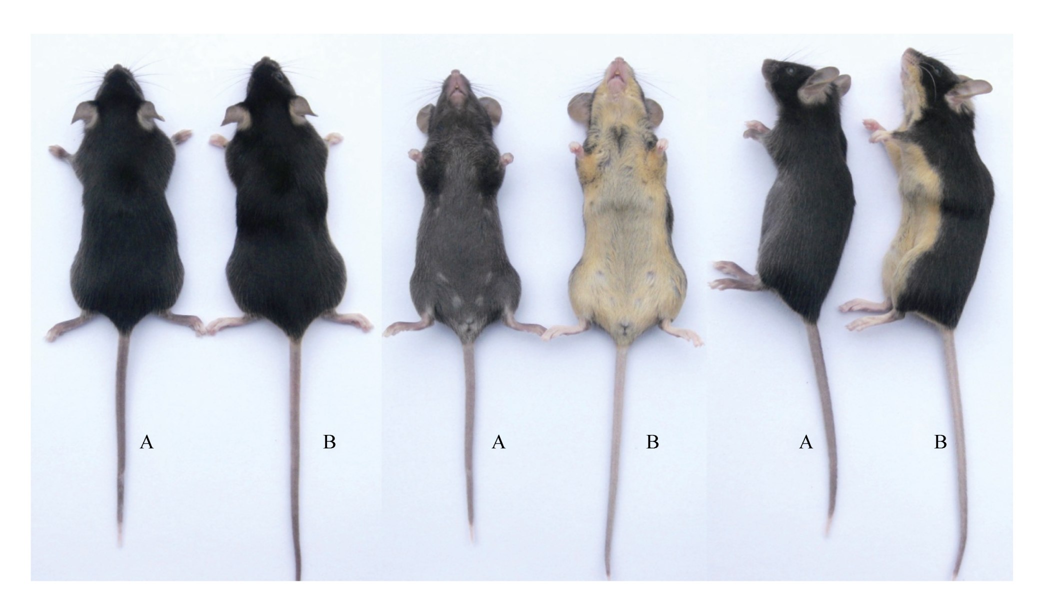


图 1 腹侧黄斑小鼠外观

Fig. 1 Appearance of VY^{Slac}

A) 背景品系 B_6 小鼠, 头部及背部黑色; B) 腹侧黄斑小鼠, 整个腹侧面从下颌、颈部延伸至胸腹部均被覆黄色被毛。

A) Background strain B_6 mouse, black head and black body; B) VY^{Slac}, the entire ventral surface from the lower jaw, neck, chest to abdomen was covered by yellow coat.

7 日龄的腹侧黄斑小鼠背部皮肤组织内黑色素细胞的数量及毛囊内黑色素含量与其背景品系 B_6 小鼠相比无明显差异; B_6 小鼠腹部皮肤毛囊黑色素含量较多, 分布均匀, 表皮内多巴(+)黑色素细胞散在分布; 而腹侧黄斑小鼠腹部皮肤表皮内多巴染色阴性, 毛囊壁多巴(+)黑色素细胞显著减少, 毛发根部可见规律排布的色素颗粒(图 2)。

腹侧黄斑小鼠背部毛发的结构及黑色素的排列规则、致密, 与 B_6 无明显差别, 黄斑小鼠腹部毛发明显较 B_6 浅淡, 与毛根部位多巴染色阳性不同, 缺乏黑色素, 但结构正常; 部分细小绒毛中, 仍可见规律排布、色泽浅的黑素颗粒(图 3)。

腹侧黄斑小鼠的脑、心、肝、脾、肺、肾、肾上腺、胸腺、睾丸、附睾、子宫、卵巢等主要脏器的位置、色泽、形态及大体结构均未发现异常。各主要组织脏器的石蜡切片亦未发现异常。血液生理指标检测结果无显著性差异(数据见本刊网页补充材料)。

2.2 突变基因的染色体初步定位

腹侧黄斑小鼠为 B_6 背景, 我们采用 D_2 作为定位品系。将腹侧黄斑小鼠与 D_2 交配繁殖 F_1 代小鼠, 再将带有黄斑表型的 F_1 小鼠回交 D_2 得到 F_2 代小鼠, 先后共得到 196 只 F_2 代小鼠, 其中有黄斑表型者 97 只, 表型正常者 99 只; 提取这些小鼠基因组 DNA, 用于 PCR 扩增后的基因型分析。F_2 代小鼠的被毛颜色共有 4 种, 除了与亲本 B_6(黑色)及 D_2(灰白色)相同的被毛颜色外, 还有棕色及灰色, 无论是哪种颜色, 均能可靠地区分腹侧黄斑表型。将所有 F_2 小鼠根据是否具有黄斑表型分成两个群体, 分别编号用于基因定位。

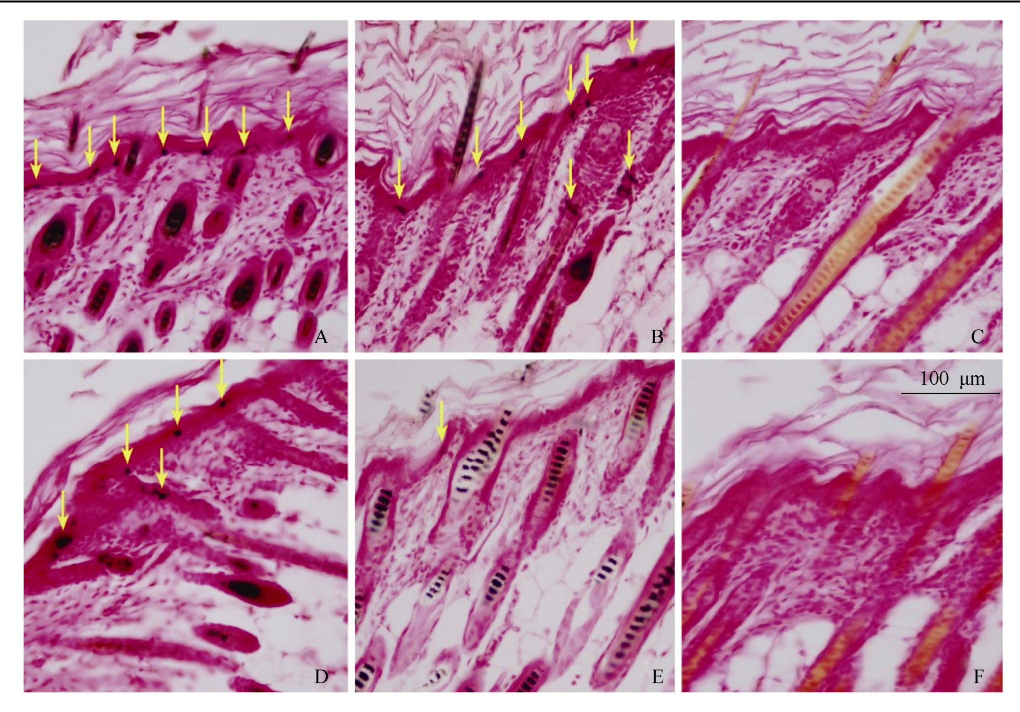


图 2 小鼠皮肤切片的多巴染色(×400)

Fig. 2 Slices of mouse skin with dopa staining (×400)

A) B_6 小鼠背部皮肤组织; B) 腹侧黄斑小鼠背部皮肤组织; C) BALB/c 小鼠背部皮肤组织; D) B_6 小鼠腹部皮肤组织; E) 腹侧黄斑小鼠腹部皮肤组织; F) BALB/c 小鼠腹部皮肤组织。黄色箭头指示为黑色素细胞。

A) Dorsal skin of B_6 mouse; B) Dorsal skin of VY^{Slac} mouse; C) Dorsal skin of BALB/c mouse; D) Ventral skin of the B_6 mouse; E) Ventral skin of VY^{Slac} mouse; F) Ventral skin of BALB/c mouse. Yellow arrows indicated melanocytes.

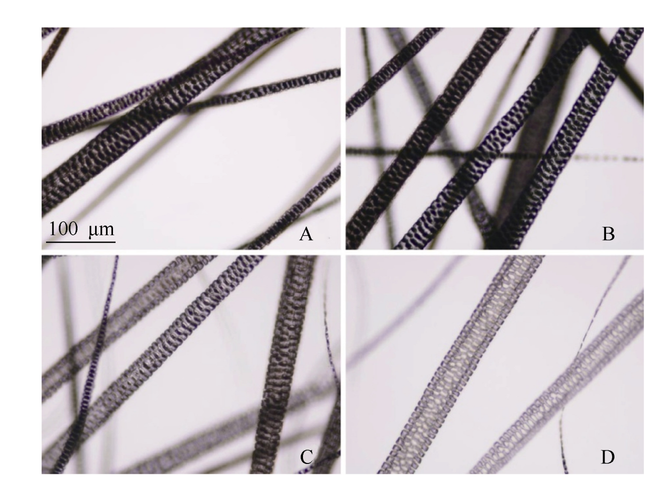


图 3 腹侧黄斑小鼠和 B_6 小鼠被毛镜下照片(×400)

Fig. 3 Photograph of hair under microscopic (×400)

A) B_6 小鼠背部被毛; B) 腹侧黄斑小鼠背部被毛; C) B_6 小鼠腹部被毛; D) 腹侧黄斑小鼠腹部被毛。

A) Dorsal hair from B_6 mouse; B) Dorsal hair from VY^{Slac} mouse; C) Ventral hair from B_6 mouse; D) Ventral hair from VY^{Slac} mouse.

对突变基因所在染色体的定位，是通过运用本实验室先前建立的微卫星体系将腹侧黄斑小鼠突变基因进行连锁分析。先将 48 个 F_2 鼠尾的 DNA 标本用 39 个微卫星组成的标记系统逐一扩增，由于微卫星是共显性标记，分析 F_2 检测结果，把有腹侧黄斑表型同时伴 B_6 及 D_2 微卫星标记及无腹侧黄斑表型同时伴有 D_2 微卫星标记的标本算为亲本组合数，反之作为重组合记数(图 4)。计算各个微卫星与突变基因在实际重组率情况下的 LOD 值。*D2Mit229* 与突变表型的 LOD 值为 5.79，确定与腹侧黄斑突变基因连锁(表 1)。小鼠第 2 号染色体全长 117 cM，*D2Mit249* 位于距着丝粒 47.5 cM 处，与突变基因的重组率约为 26.1%，遗传距离是 26.1 cM；而 *D2Mit229* 距着丝粒 99 cM，与突变基因的重组率约为 14.6%，遗传距离是 14.6 cM，故推定突变基因位于 *D2Mit249* 与 *D2Mit229* 之间距着丝粒约 78 cM 附近(图 5①)。

2.3 突变基因的精确定位

在突变基因初步定位于 *D2Mit249*(47.5 cM)与 *D2Mit229*(99.0 cM)之间距着丝粒约 78 cM 的基础上，课题组在突变基因附近筛选了 *D2Mit62*(65 cM)及 *D2Mit311*(83.1 cM)标记。用上述微卫星对 48 例腹侧黄色被毛小鼠 F_2 代进行了基因型的检测，结果发现突变基因与 *D2Mit62* 有 7 例发生交换，与 *D2Mit311* 间有 4 例交换，而 *D2Mit62* 和 *D2Mit311*

表 1 不同微卫星与腹侧黄斑突变基因的连锁分析结果

Tab. 1 Linkage analysis results of different markers and VY^{Slac}

微卫星名称 Microsatellite	微卫星位置 (染色体, 距着丝点距离)(cM) Position of microsatellites (chromosome, distance from centromere)	检测的 F_2 数量 Number of F_2 detected	重组比[a](亲组合：重组合) Recombination ratio (parental combination：recombinant)	LODS 值 (按实际重组率计算) LODS (At actual recombination ratio)	是否连锁 Linkage or not
D8Mit4	8, 14	45	29:16	0.237	
D8Mit320	8, 59	45	26:19	0.043	
D2Mit293	2, 10	46	31:15	1.23	
D2Mit249	2, 47.5	46	34:12	2.38	
D2Mit229	2, 99	48	41:7	5.79	确定连锁

[a] 亲组合与重组合的计算方法, 以突变基因与 *D2Mit249* 连锁分析为例, 见表 2 及图 4。

As an example of calculation method of parental combination and recombination, the course of linkage analysis between mutation gene and *D2Mit249* is shown in Tab. 2 and Fig. 4.

表 2 腹侧黄色被毛突变基因与 *D2Mit249* 的连锁分析

Tab. 2 Detailed data of linkage analysis between VY^{Slac} and *D2Mit249*

	互交亲本 Crossing parents		测交亲本 Back-crossing parents		F_2 表型及数目 Number and phenotypes of F				重组值 Recombinant score
					亲组合 Parental combination		重组合 Recombinant		
	B_6	D_2	F_1	$\mathbf{D_2}$					
基因型 Genotype	m b6 / + b6	+ d2 / + d2	m b6 / + d2	+ d2 / + d2	m b6 / + d2	+ d2 / + d2	m d2 / + d2	+ b6 / + d2	----
	------	----	-----	----	22	12	4	8	12/46

m 为突变基因, +为野生型, b6 为 B_6 型 *D2Mit249*, d2 为 D_2 型 *D2Mit249*。

m indicates mutation gene; + indicates wild type; b6 is the *D2Mit249* of B_6 and d2 is the *D2Mit249* of D_2.

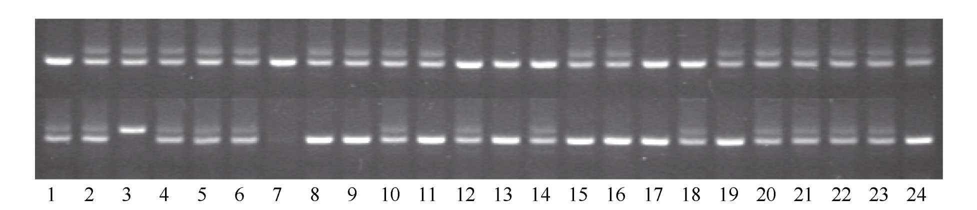


图 4 *D2Mit249* 对腹侧黄斑小鼠 F_2 检测结果

Fig. 4 Electrophoresis photographs detected by *D2Mit249*

上排第 24 泳道为 F_1 对照, 上排第 1～12、15、16、21～23 泳道为具有黄斑表型 F_2, 其余为无表型 F_2, 其中第 1、7、12、19、20 泳道重组, 其余连锁; 下排第 1～6、22～24 泳道检测对象为具黄斑表型的 F_2, 其余均为无表型 F_2, 其中第 10、12、14、18、20、21、24 泳道重组, 第 3 泳道显示基因型为 B_6 纯合型, 原因不明, 第 7 泳道扩增失败, 其余泳道均为连锁。

Upper: Lane 24 was the control of F_1 mouse; lane 1 to 12, 15, 16 and 21 to24 were F_2 mice with mutant phenotype, and other lanes were wild F_2 mice. Lanes 1, 7, 12, 19 and 20 showed linkage, and others showed recombination.

Lower: Lane 1 to 6 and 22 to24 were from F_2 mice with mutant phenotype, and other lanes were wild F_2 mice. Lanes 10, 12, 14, 18, 20, 21 and 24 showed linkage, and others showed recombination except lane 7, which failed to be amplified and lane 3, which showed B_6 homozygote for unknown reasons.

之间有 10 例交换。经分析, 突变基因介于 *D2Mit62* 和 *D2Mit311* 之间(图 5②)。我们在这个区域内再次筛选微卫星标记 *D2Mit17*(69 cM)及 *D2Mit310* (77.6 cM)，并对 92 只 F_2 小鼠(其中具有腹侧黄色被毛表型者 47 只, 无腹侧黄色被毛表型者 45 只)进行连锁分析, 发现突变基因与 *D2Mit17* 有 14 例交换, 与 *D2Mit310* 间有 7 例交换, 而 *D2Mit17* 和 *D2Mit310* 之间有 18 例交换, 分析后确定突变基因介于两微卫星之间(图 5③)。随后我们继续上述工作, 在 *D2Mit17* 和 *D2Mit310* 之间的区域筛选并得到 2 个有效微卫星标记：*D2Mit304*(73 cM) 及 *D2Mit307*(74.9 cM), 分别扩增 92 个样本发现：突变基因与 *D2Mit304* 有 12 例交换, 与 *D2Mit307* 有 10 例, 而 *D2Mit304* 和 *D2Mit307* 之间有 2 例交换。经连锁分析计算, 突变基因不在 *D2Mit304* 和 *D2Mit307* 之间, 而在 *D2Mit307* 下游远离着丝粒处。在对 *D2Mit307* 和 *D2Mit310* 进行连锁分析后, 我们将突变基因位置缩小到 *D2Mit307* 和 *D2Mit310* 之间, 即距着丝粒 74.9～77.6 cM 范围内, 分析结果见图 5④。

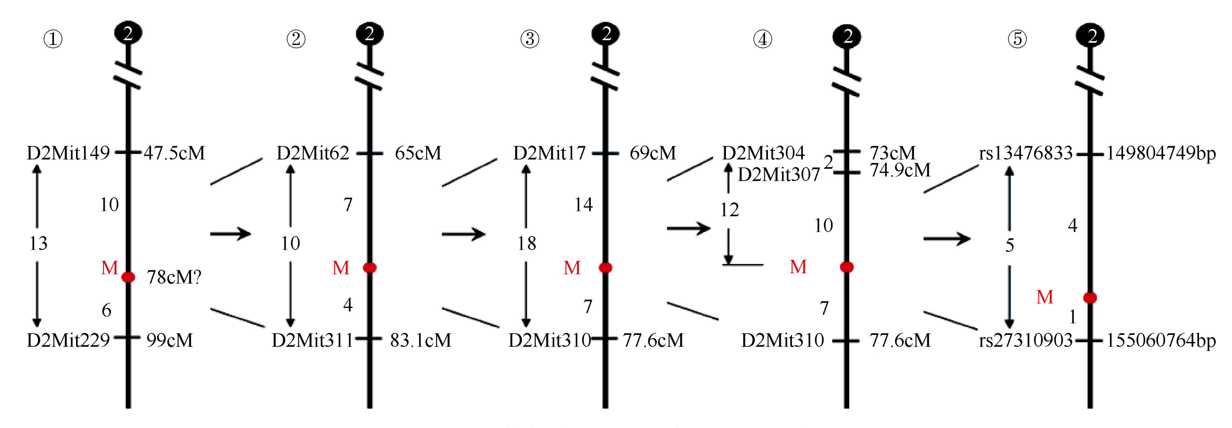


图 5 腹侧黄色被毛小鼠突变基因定位过程

Fig. 5 Mapping process of VY^{Slac} mutant gene

竖线示第 2 号染色体，竖线左侧为各遗传标记及各标记间已检测出来的发生交换标本数目，右侧是各标记相应距离着丝粒的遗传距离或物理距离，M 表示待定位的黄斑突变位点。

The left side of each chromosome shows the mutant gene, markers and their recombinant ratio between different sites. The right shows the position. M indicates the mutant gene.

为了进一步缩小定位范围，需要再选取新的基因组标记进行连锁分析。在 *D2Mit307* 和 *D2Mit310* 之间 2.7 cM 范围内已没有合适的微卫星位点的情况下，我们先后从 20 个 SNP 标记中筛选到 5 个可用标记，扩增 SNP 标记的设计引物及多态性见表 3。利用这 5 个 SNP 对 196 个 F_2 小鼠 DNA 样本进行连锁分析：突变基因与 *rs33521370* 和 *rs29860819* 之间均未发生交换，突变基因与 *rs27310903* 间仅有 1 例发生交换，与间有 4 例交换，*rs13476833* 与 *rs27310903* 间发生交换的有 5 例，最终突变基因被定位于 *rs13476833* 与 *rs27310903* 之间距着丝粒 149 804749 bp 到 155 060 764 bp 间大约 5 256 015 bp 范围内，分析结果见图 5 ⑤。

3 讨 论

3.1 关于黄斑小鼠的表型特征

对突变系小鼠进行必要的表型分析是深化研究、突变基因鉴定及模型开发的工作基础。VY^{Slac}

表 3 微卫星或 SNP 引物序列以及标记的多态性

Tab. 3 Primer sequence and polymorphism of markers

标记名称 Marker	引物序列 Primer(5'-3')	标记多态性 (B_6/D_2)Polymorphism (bp)	
D2Mit62	F: *GGATACCGTTTGGAAAGTAAACC* R: *GCAAGAAGCACAGGAGGC*	162/ 146	—
D2Mit17	F: *AGGCAATTACAAGGCCTGG* R: *CACCCATCTCCCTCAGTCAT*	205 /220	—
D2Mit304	F: *AAGCAGGTGTCGCTGATTG* R: *AGAAGATGGACCGAGGGG*	120 /186	—
D2Mit307	F: *AGTTCCAGGGAATGAAACACC* R: *ACACCTCTGCCAACAGTGC*	150 /156	—
D2Mit310	F: *TTTAAATGAAGAATAAGGTCAGAAACA* R: *GCATTAATTCTCATTCTCAATAATGG*	138 /126	—
D2Mit311	F: *ACAGGCAGCCTTCCCTTC* R: *TCTGTCCCGCTTCTGTTTCT*	128 /108	—
rs13476833	F: *GTCACACCAACCCCAGAGATTAC* R: *GTCCGTTCAGAGGCTTGTGC*	—	G/A
rs33521370	F: *TGCCCATCACATTTCCATTCA* R: *CCTCCTTCTCCCTCTTCCACAA*	—	T/A
rs29860819	F: *CCGGGTACAGATATGGGGAAAAC* R: *GGGCTGCCTAGGAGAATGAAATA*	—	C/T
rs27310903	F: *AGAAATCCTGAATGCTGGTGTTA* R: *AAAAGGATGTACTGGGCTGAGGA*	—	C/T
rs3698553	F: *AGAGACAAGGGCAGATAAATA* R: *CCTTGAGATGGTGCGTGACA*	—	C/T

小鼠腹部表皮及毛囊内多巴(+)黑色素细胞较其背景品系 B_6 少，毛发镜检可见腹部毛发颜色浅黄、多数毛发无黑色素沉积，但结构正常。本实验采用多巴染色鉴别含黑素小体的成熟黑色素细胞，观察结果不能代表黑色素细胞的实际数量，但能够反映 VY^{Slac} 小鼠黑色素细胞合成黑素的功能(Spritz et al, 2003)。黑素合成发生在黑素细胞中，这种细胞来自神经嵴，大致经历了神经嵴细胞、黑素母细胞和黑素细胞三个发育阶段。黑素是一种生物多聚体，它广泛存在于人和动物皮肤、毛发和眼睛中。动物黑素可分为两类：一是真黑素，不含硫原子，呈棕色或黑色；二是脱黑素，含硫原子，呈黄色或微红棕色。动物与人的皮肤及毛发色素沉着决定于其所含真黑素与脱黑素的相对量(Hornyak, 2006; Price & Fischer, 2001)。真黑素与脱黑素间的比例由多种不同的因素所调控，包括色素酶的表达、酪氨酸和细胞内包含巯基的还原剂的生物利用度。*Agouti*、*Pomc* 和 *Extension* 等基因参与了调节过程，其中小鼠的 *agouti* 位点位于 2 号染色体，其编码一种旁分泌信号分子(agouti signal protein, ASP)，可使毛囊黑素细胞合成脱黑素而不是真黑素。*agouti* 基因的表达会引起脱黑素的产生，不表达时则引起真黑素的产生，其对真黑素和脱黑素之间转换的作用仅局限于皮肤，而体内其他部位的黑素细胞及控制眼色的色素细胞不受影响(Matsunaga et al, 2000)。VY^{Slac} 小鼠黄斑腹部黄斑的形成机制与黑色素细胞缺乏相关还是与黑色合成比例相关，尚需进一步明确。但现有资料显示，如果是黑素细胞的迁徙问题，如 *Kit* 基因突变导致的黑色素细胞迁徙问题通常导致腹部被毛颜色白化，而腹侧黄斑形成最大的可能性不在于黑色素细胞的缺失，而是黑色素合成障碍。

腹侧黄斑是突变系小鼠的外在表现，这种小鼠是否同时伴有其他具有疾病特征的表型呢？我们在检索小鼠表型组数据库(http://phenome.jax.org)时，发现有 1 例突变小鼠与 VY^{Slac} 腹侧黄斑小鼠表型相似(http://phenome.jax.org/db/q?rtn=strains/details&strainid=1)，这种小鼠的胼胝体缺失，而且海马连合严重萎缩，在行为上表现为自闭症(Wahlsten et al, 2003; Scattoni, 2008)。但是我们对 VY^{Slac} 小鼠的胼胝体及海马连合处进行解剖观察，未见缺失或缩小。另有研究表明，腹侧黄斑相关基因如 *agouti* 表达异常，不仅仅会导致皮肤毛发的色素变化，还与动物与环境的适应性进化(Manceau et al, 2011)及血糖水平密切相关(Overton & Leibel, 2011)。我们也发现了 VY^{Slac} 小鼠血糖水平不稳定(资料未显示)，正对其进行深入细致的检测分析。

3.2 腹侧黄斑的定位与候选基因

与通过 FISH 法定位特定基因组序列不同（Liu et al, 2008），通过连锁分析进行突变基因定位是遗传学的基本手段，由于小鼠基因组标记十分丰富，这一工作比较方便，但必要的表型分析及小鼠表型组数据库的充分利用对于提高突变基因定位的效率特别有帮助。腹侧黄色被毛是一种稀有表型，在对其定位之前，我们通过小鼠表型组数据库，发现 *BTBR T+tf/J* 小鼠与 VY^{Slac} 小鼠具有相似的表型，且相关的突变基因位于第 2、第 8 号及第 17 号染色体上(http://phenome.jax.org/db/q?rtn=strains/details&strainid=1)，因此，我们优先使用这三条染色体上的微卫星标记进行连锁分析，在扫描第 2 号染色体时就将突变基因成功定位。这样的定位策略大幅度减少了工作量，提高了工作效率。尽管在定位过程中进行了反复多次的标记筛选，通过 196 只 F_2 小鼠很快就将突变基因所在区域缩小到 *rs13476833* (距着丝粒 149 804 749 bp)与 *rs27310903* (距着丝粒 155 060 764 bp)之间约 5 256 015 bp 的范围内。

由于 *agouti* 基因与黄斑表型的密切联系，加上黄斑基因被定位在 *agouti* 附近(http://www.informatics.jax.org/javawi2/servlet/WIFetch?page=markerDetail&key=3, Chr2:154617138-154876748 bp)，我们以 *agouti* 为候选基因，做了多次 mRNA 的测序工作，但一直未能鉴定出突变碱基，尽管如此，我们仍然怀疑是该基因突变导致了小鼠腹侧黄斑的生成。由于，目前定位的区间略大，5.3 Mb 范围内尚有 157 个基因，认定 *agouti* 为突变基因尚有一定风险，课题组将进一步繁殖 F_2 小鼠到 600 只以上，利用更高密度的 SNP 标记将突变基因定位到 50 万碱基以内，这样鉴定突变基因的可靠性会更高。如果确认 *agouti* 不是基因突变，这一小鼠将有极大的科学价值，因为到目前为止，除 *agouti* 基因以外，在突变基因的定位区间内，尚未发现其他基因与腹侧黄斑形成有关，即便是 *agouti* 基因突变，极可能是 *agouti* 基因的一个新等位基因，对研究 *agouti* 基因的功能也有一定意义。本文结果对进一步精细定位并鉴定黄斑突变基因奠定了良好的基础。

参考文献：

Balling R. 2001. ENU mutagenesis: analyzing gene function in mice [J]. *Annu Rev Genomics Hum Genet,* **2**: 463-492.

Caspary T. 2010. Phenotype-driven mouse ENU mutagenesis screens [J]. *Methods Enzymol,* **477**: 313-327.

Gong ZJ, Zhan RZ. 1994. Pathological Production and Staining Techniques [M]. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishing House. [龚志锦, 詹镕洲. 1994. 病理组织制片和染色技术 [M]. 上海: 上海科学技术出版社.]

Hornyak TJ. 2006. The developmental biology of melanocytes and its application to understanding human congenital disorders of pigmentation [J]. *Adv Dermatol,* **22**: 201-218.

Liu Y, Nie WH, Huang L, Wang JH, Su WT, Lin CC,Yang FT. 2008. Cloning, characterization, and FISH mapping of four satellite DNAs from black muntjac (Muntiacus crinifrons) and Fea's muntjac (M. feae) [J]. *Zool Res*,**29** (3): 225-235. [刘 妍，佴文惠，黄 玲，王金焕，苏伟婷, LIN Chyi Chyang，杨凤堂. 2008.黑麂和费氏麂四种卫星 DNA 的克隆特征和染色体定位[J]. 动物学研究,**29** (3): 225-235.]

Manceau M, Domingues VS, Mallarino R, Hoekstra HE. 2011. The developmental role of Agouti in color pattern evolution [J]. *Science,* **331**(6020): 1062-1065.

Matsunaga N, Virador V, Santis C, Vieira WD, Furumura M, Matsunaga J, Kobayashi N, Hearing VJ. 2000. *In situ* localization of agouti signal protein in murine skin using immunohistochemistry with an ASP-specific antibody [J]. *Biochem Biophys Res Commun,* **270**(1): 176-182.

Morgan H, Beck T, Blake A, Gates H, Adams N, Debouzy G, Leblanc S, Lengger C, Maier H, Melvin D, Meziane H, Richardson D, Wells S, White J, Wood J, EUMODIC Consortium, de Angelis MH, Brown SDM, Hancock JM, Mallon AM. 2010. EuroPhenome: a repository for high-throughput mouse phenotyping data [J]. *Nucleic Acids Res,* **38**(S1): D577-D585.

Overton JD, Leibel RL. 2011. *Mahoganoid* and *mahogany* mutations rectify the obesity of the yellow mouse by effects on endosomal traffic of MC4R protein [J]. *J Biol Chem,* **286**(21): 18914-18929.

Price ER, Fischer DE. 2001. Sensorineural deafness and pigmentation genes: melanocytes and the *Mitf* transcriptional network [J]. *Neuron,* **30**(1): 15-18.

Scattoni ML, Gandhy SU, Ricceri L, Crawley JN. 2008. Unusual repertoire of vocalizations in the BTBR T+tf/J mouse model of autism [J]. *PLoS One,* **3**(8): e3067.

Spritz RA, Chiang PW, Oiso N, Alkhateeb A. 2003. Human and mouse disorders of pigmentation [J]. *Curr Opin Genet Dev,* **13**(3): 284-289.

Stottmann RW, Beier DR. 2010. Using ENU mutagenesis for phenotype-driven analysis of the mouse[J]. *Methods Enzymol,* **477**: 329-348.

Wahlsten D, Metten P, Crabbe JC. 2003. Survey of 21 inbred mouse strains in two laboratories reveals that BTBR T/+ *tf/tf* has severely reduced hippocampal commissure and absent corpus callosum [J]. *Brain Res,* **971**(1): 47-54.

Wilkinson P, Sengerova J, Matteoni R, Chen CK, Soulat G, Ureta-Vidal A, Fessele S, Hagn M, Massimi M, Pickford K, Butler RH, Marschall S, Mallon AM, Pickard A, Raspa M, Scavizzi F, Fray M, Larrigaldie V, Leyritz J, Birney E, Tocchini-Valentini GP, Brown S, Herault Y, Montoliu L, de Angelis MH, Smedley D. 2010. EMMA-mouse mutant resources for the international scientific community [J]. *Nucleic Acids Res,* **38**: D570-D576.

Wu BJ, Mao HH, Shao YX, Xue ZF, Li HD. 2003a. Four kinds of ENU-induced white spot mice and chromosome locations of the mutant genes [J]. *Chin Sci Bull,* **48**(24): 2658-2664.

Wu BJ, Mao HH, Zhu H, Yan ZF, Yang L, Sun Q, Xu XM, Xue ZF, Li HD. 2003b. PCR conditions and application of 39 mouse microsatellites [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin,* **11**(4): 216-220. [吴宝金, 茅慧华, 朱洪, 阎志峰, 杨玲, 孙强, 徐向明, 薛整风, 李厚达. 2003. 小鼠 39 个微卫星的 PCR 条件及其运用 [J]. 中国实验动物学报, **11**(4): 216-220.]

Wu BJ, Yin LJ, Lu ZL, Yin YS, Yang WW, Yang R, Kang XD, Liu GJ, Yin HP, Yu LP, Gu ME, Wu PL. 2010. Abnormal gonad development in $Kit^{W\text{-}2Bao}$ mice caused by a *Kit* gene missense mutation [J]. *Chin Sci Bull,* **55**(36): 4143-4149.

Wu PL, Yin HP, Yin LJ, Zhu J, Zeng YM, Liu GJ, Kang XD, Yu LP, Gu ME, Yuan H, Wu BJ. 2009. Gonadial abnormality and homozygous decease from the nonsense mutation of Kit in W^{3Bao} Mouse [J]. *Zool Res,* **30**(1): 45-52. [吴培林, 尹洪萍, 殷黎静, 朱洁, 曾咏梅, 刘桂杰, 亢晓冬, 俞利平, 顾美儿, 袁红, 吴宝金. 2009. *Kit* 无义突变致 W^{3Bao} 小鼠生殖腺异常及纯合子贫血死亡[J]. 动物学研究, **30**(1): 45-52.]

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 298−303 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03298

补偿生长对异育银鲫 IGF-1、IGFBP-1 水平及 IGF-1、IGF-1R mRNA 表达的影响

沈文英*, 任 岗, 祝尧荣

(绍兴文理学院 生命科学学院，浙江 绍兴 312000)

摘要：该实验分析饥饿和恢复投喂对异育银鲫血液 IGF-1 和 IGFBP-1 水平和肝脏 IGF-1、白肌 IGF-1R mRNA 表达量的影响。结果显示： 饥饿期(14 d)血液中 IGF-1 和 IGFBP-1 水平逐渐下降, 在饥饿第 14 天均出现显著性降低(P<0.05); 恢复投喂后第 1 天 IGF-1 迅速恢复到对照组水平, 而 IGFBP-1 水平仍显著低于对照组(P<0.05), 随后逐渐升高, 直至于恢复投喂第 14 天后显著高于对照组水平(P<0.05); 饥饿期肝脏 IGF-1 mRNA 表达量呈下降趋势, 但与对照组无显著性差异(P>0.05); 恢复投喂初期(第 1、3 天), IGF-1mRNA 表达量仍继续下降(P<0.05), 对营养条件的变化反应滞后, 至第 7 天, 表达水平恢复到对照组水平。白肌 IGF-1R mRNA 表达水平在饥饿第 3 天出现显著性下降(P<0.05), 继续饥饿其水平出现补偿性升高; 恢复投喂后第 14 天 IGF-1R mRNA 表达量显著高于对照组水平(P<0.05)。该结果揭示恢复投喂期高水平的 IGFBP-1 含量和 IGF-1R mRNA 表达量可能通过提高 IGF-1 的促生长作用参与异育银鲫的补偿生长调节。

关键词：异育银鲫; 补偿生长; IGF-1; IGFBP-1; IGF-1 mRNA; IGF-1R mRNA
中图分类号：Q959.468; S917.4 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0298-06

Effects of compensatory growth on the levels of IGF-1, IGFBP-1 and expressions of IGF-1 mRNA, IGF-1R mRNA in *Carassius auratus gibelio*

SHEN Wen-Ying*, REN Gang, ZHU Yao-Rong

(*College of Life Science*, *Shaoxing University*, *Shaoxing* 312000, *China*)

Abstract: We studied the effects of starvation and re-feeding on the levels of plasma IGF-1, IGFBP-1 and expressions of hepatic IGF-1 mRNA and muscle IGF-1R mRNA in *Carassius auratus gibelio*. During the two week starvation period, both the levels of plasma IGF-1 and IGFBP-1 decreased and were significantly lower on day 14 (P<0.05). On the first day of re-feeding, the level of plasma IGF-1 increased sharply, to the level of control group, and had no significant changes for the remaining days. While the level of plasma IGFBP-1 was still greatly lower than that of control group at the first day of re-feeding, it increased significantly higher than that of control group by day 14 (P<0.05). During the starvation period, expression of IGF-1 mRNA in liver decreased, but it was not statistically different from that of the control group (P>0.05). During the early period of re-feeding, the abundance of IGF-1 mRNA was still significantly lower than that of control group (P<0.05), then increased to the level of control group on day 7. IGF-1R mRNA showed a decreasing trend after starvation, and reached a significantly low value on day 3 (P<0.05). After re-feeding, the abundance of IGF-1R mRNA increased to peak at day 14. These results indicate that the higher level of IGFBP-1 in serum and IGF-1R mRNA in muscle after re-feeding could improve the promoting growth effect of IGF-1 to participate in the regulation of compensatory growth.

Key words: *Carassius auratus gibelio*; Compensatory growth; IGF-1; IGFBP-1; IGF-1 mRNA; IGF-1R mRNA

胰岛素样生长因子(insulin-like growth factor, IGF)家族包括 IGF-1、IGF-2、IGF-1 受体(IGF-1 receptor, IGF-1R)、以及 IGF 结合蛋白(IGF binding proteins, IGFBPs)。其中, IGF-1 是 GH/IGF 生长轴的

收稿日期：2012-02-15；接受日期：2012-04-18
基金项目：浙江省自然科学基金(Y3090171)
*通信作者(Corresponding author)，Tel: +86-575-88345863, E-mail: zoology@usx.edu.cn
第一作者简介：沈文英(1970 一), 女, 副教授, 从事水生经济动物的生长和营养研究

重要生长因子, 具有调节细胞代谢, 促进细胞增殖和分化、抑制细胞凋亡、调节生殖和免疫相关激素分泌等多种生理功能(Jones & Clemmons,1995)。在鱼类体内, IGF-1 的表达和生物学活性受到激素、生长因子、营养状况、发育阶段、性别等多种因素的影响(Duan, 1998)。哺乳动物研究表明, 营养状况是影响 IGF-1 表达或血液 IGF-1 水平的重要因素, 营养状况通过调节 IGF-1 转录来实现对 IGF-1 的调控, 即 IGF-1 在动物能量代谢中增加蛋白质同化、促进葡萄糖吸收与利用的同时也受到能量物质的反馈调节(Wood et al, 2005)。在许多硬骨鱼类中, 血液中 IGF-1 水平与日粮量和日粮蛋白水平有直接联系(Pierce et al, 2005; Wilkinson et al, 2006)。目前, 国内、外对鱼类 IGF-1 的研究多集中在 IGF-1 mRNA 表达水平(Chauvigné et al, 2003; Chen et al, 2010; Hua & Lin, 2001)以及 IGF-1 水平和营养状况的相互作用方面(Pierce et al, 2005; Wilkinson et al, 2006), 关于 IGF-1 受体及 IGFBPs 的作用还少有报道。

异育银鲫(*Carassius auratus gibelio*)是我国重要的淡水养殖经济鱼类。现有研究表明，不同体重异育银鲫在饥饿 1～2 周后恢复投喂出现完全或部分补偿生长, 营养限制后的异育银鲫在恢复投喂期间摄食率、特定生长率和对食物的利用效率明显提高(Cui et al, 2006; Qian et al, 2000; Ren et al, 2010; Shen et al, 2003)。本研究分析补偿生长过程中异育银鲫肝脏 IGF-1、白肌 IGF-1R mRNA 表达水平以及血液 IGF-1 和 IGFBP-1 水平的变化, 旨在探索 IGF-1、IGF-1 受体及其结合蛋白在不同营养状况下对鱼体生长的调节作用, 从分子水平阐明异育银鲫补偿生长的内分泌调节机理, 为水产养殖中科学地调控和应用鱼类的补偿生长能力提供理论支持。

1　材料与方法

1.1　实验对象

同一批次 2 龄异育银鲫饲养于实验池, 实验前投喂常规饵料, 适应 1 周后选取体重(85.0±4.0) g 的异育银鲫 300 尾作为实验鱼。

1.2　实验设计

将 300 尾实验鱼随机分成对照组和实验组, 每组设 3 个重复, 每个重复 50 尾, 雌、雄鱼比例约为 8:1。4 周的实验期间, 对照组(F)正常投喂, 实验组饥饿 2 周后按照对照组投喂方式恢复投喂 2 周, 实验水温 22～25 ℃。

1.3　取样

分别在饥饿第 1、3、7、14 天(S1、S3、S7、S14)和恢复投喂第 1、3、7、14 天(R1、R3、R7、R14)的 8:30—12:00 取样, 每个重复取样 3 尾。MS-222 快速麻醉后, 用一次性注射器从尾静脉窦抽取约 1 mL 血液置于冰上, 4 ℃放置 4 h 后, 6 000 r/min 4 ℃离心 10 min, 取上层血清至 1.5 mL 离心管于−20 ℃保存。取血后立即用 180 ℃烘烤 8 h 以上的剪刀和镊子切开鱼体, 分别取肝脏和白肌组织 0.5～1.0 g, 置于液氨中速冻后转至−80 ℃超低温冰箱保存。

1.4　血液 IGF-1 和 IGFBP-1 水平的测定

采用上海江莱生物技术有限公司鱼类 IGF-1 和 IGFBP-1 定量检测试剂盒, 在酶标仪(Bio-Rad 680, USA)上严格按说明书测定血液 IGF-1 和 IGFBP-1 含量。

1.5　组织总 RNA 的提取和 IGF-1、IGF-1R mRNA 的测定

将每 100 mg 肝脏或白肌组织样品加入 1 mL 的 Trizol 试剂(Invitrogen 公司), 用电动匀浆器进行匀浆, 按 Trizol 试剂盒说明提取肝脏和白肌总 RNA, 并用 1.2％琼脂糖凝胶电泳和 NanoDrop® ND-1000 紫外分光光度计(Thermo 公司)测定 RNA 浓度和纯度。

以 2 μg 总 RNA 为模板, 用 SuperScript™ III Reverse Transcriptase(Invitrogen 公司)试剂盒和 Oligo$(dT)_{18}$合成 cDNA, 反应条件为：20 μL 反应体系在 65 ℃水浴 5 min, 冰浴 2 min, 50 ℃温育 60 min, 70 ℃ 温育 15 min 使酶失活。

异育银鲫 IGF-1 mRNA 荧光定量 PCR 引物根据鲤科鱼类 IGF-1 序列(AF216775, EU051323)保守区域设计, IGF-1R mRNA 荧光定量 PCR 引物根据鲤科鱼类 IGF-1R 序列(AF216772, AF216773, AF216799)保守区域设计(表 1); 选用 *GAPDH* 和 *Tuba*1 作为双内参基因, 荧光定量 PCR 反应选用 2×SYBR® Green PCR Master Mix 试剂盒(SuperArray 公司), 对 IGF-1、IGF-1R cDNA 在 Thermal Cycler PCR 仪(TaKaRa)上进行扩增。反应体系为：5 μL 2×Master Mix, 2 μL cDNA, 0.5 μL 引物(10 μM, 补水至总体积 10 μL。反应程序为 95 ℃ 10 min; 95 ℃ 10 s, 60 ℃ 60 s, 40 个循环。反应结束后分析荧光值变化曲线和融解曲线, 以 PCR 产物电泳确认扩增产物特异性。内参基因 Ct 值用

表 1 异育银鲫 IGF-1、IGF-1R mRNA 实时荧光定量 PCR 分析所用引物

Tab.1 Primers used for real-time quantitative PCR analysis of *C. auratus gibelio* IGF-1、IGF-1R

基因名称 Genes	引物序列 Sequence of primers	退火温度(℃) Annealing temperature (℃)	产物长度(bp) Length of products(bp)
Tuba1	F:5′-*TATCCTCGTATCCACTTCCCTC*-3′ R: 5′-*TCACCACGGTACAGCAGACAG*-3′	60	182
GAPDH	F: 5′-*AGTCCGTCTTGAGAAACCTGC*-3′ R: 5′-*TAACCGAACTCATTGTCATACCAT*-3′	60	222
IGF-1	F: 5′-*ATGTCTAGCGGTCATTTCTTCC*-3′ R: 5′-*CACAAACTGCAGCGTGTCTAC*-3′	60	183
IGF-1R	F: 5′-*CAACGAATCGGCTACCTTACA*-3′ R: 5′-*GCTGACCCTGCGAAACTACA*-3′	60	116

Tuba1 和 GAPDH 基因的 Ct 值几何平均数表示。IGF-1、IGF-1R 基因 mRNA 的相对表达量采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法(Livak & Schmittgen, 2001)计算。

1.6 数据分析

实验数据用 SPSS 19.0 统计分析软件进行单因素方差分析(one-way, ANOVA)， 结果以 mean±*SD* 表示, $P<0.05$ 表示有显著性差异。

2 结 果

2.1 补偿生长对异育银鲫血清 IGF-1、IGFBP-1 水平的影响

血液 IGF-1 和 IGFBP-1 水平在饥饿期(14 d)逐渐下降并均出现显著性降低($P<0.05$)。恢复投喂后第 1 天血液 IGF-1 迅速恢复到对照组水平, 但继续投喂至第 14 天，其水平无显著变化。IGFBP-1 水平在恢复投喂第 1 天仍显著低于对照组($P<0.05$), 之后逐渐升高, 直至于恢复投喂第 14 天显著高于对照组水平($P<0.05$)(图 1, 2)。

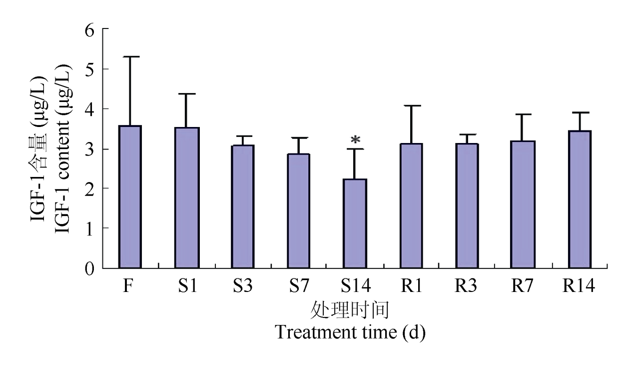


图 1 补偿生长对血清 IGF-1 水平的影响

Fig.1 Effects of compensatory growth on IGF-1 level in serum

* $P<0.05$, $n=3$.

2.2 补偿生长对异育银鲫肝脏 IGF-1 mRNA 和白肌 IGF-1R mRNA 表达水平的影响

异育银鲫肝脏 IGF-1 mRNA 表达量在饥饿期呈

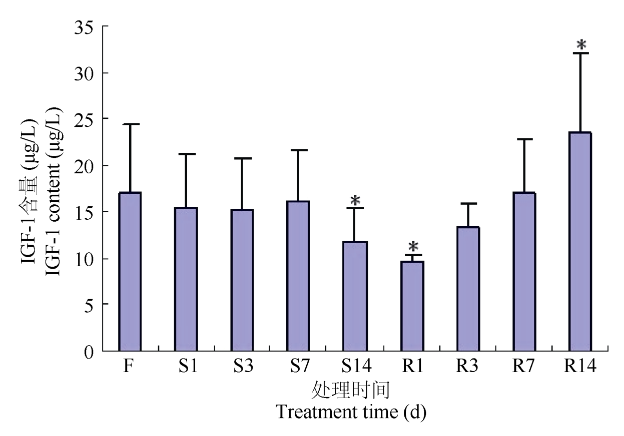


图 2 补偿生长对血清 IGFBP-1 水平的影响

Fig.2 Effects of compensatory growth on IGFBP-1 level in serum

* $P<0.05$, $n=3$.

下降趋势, 但与对照组相比不存在显著性差异($P>0.05$); 在恢复投喂初期(第 1、3 天), IGF-1mRNA 表达量仍继续下降($P<0.05$), 对营养条件的变化滞后, 出现降低后升高趋势, 至恢复投喂第 7 d, 表达水平恢复到对照组水平。白肌 IGF-1R mRNA 表达水平在饥饿第 3 天出现显著性下降($P<0.05$), 继续饥饿其水平出现补偿性升高; 恢复投喂后第 14 天 IGF-1R mRNA 显著高于对照组水平($P<0.05$) (图 3,4)。

3 讨 论

鱼类补偿生长主要受营养限制程度与持续时间、恢复投喂时间、性成熟程度等生物因素和温度、光照等非生物因素的影响(Tuichini et al, 2007)。哺乳动物补偿生长研究发现, 经过一段时间的营养限制, 雄性猪(*Sus scrofa*)、牛(*Bos taurus*) 个体比雌性具有更明显的补偿作用(Kyriazakis et al, 1991;Tudor & O’Rourke, 1980), 推测可能是由雄性所具有的较高生长率所致。鱼类补偿生长研究发现, 饥饿能降低大西洋鲑(*Salmo salar*) (Reimers et al, 1993)和北

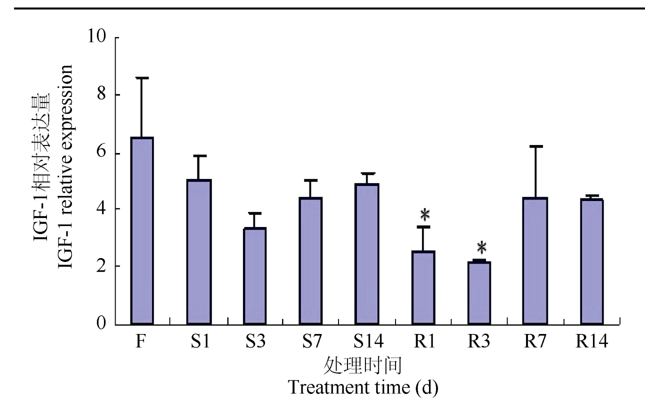


图 3 补偿生长对肝脏 IGF-1 表达水平的影响

Fig. 3 Effect of compensatory growth on the expression levels of IGF-1 mRNA in liver tissue

$^*P<0.05$, $n=3$.

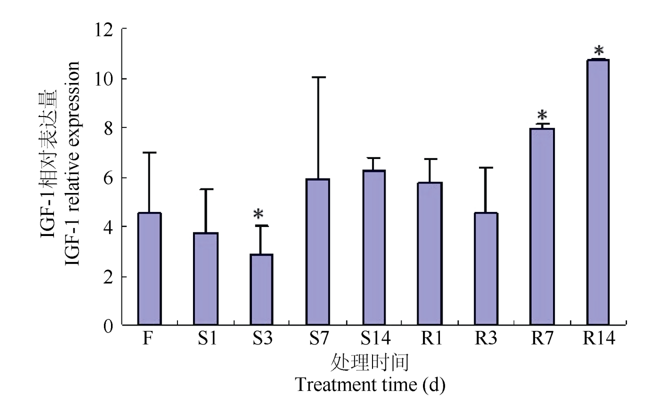


图 4 补偿生长对白肌 IGF-1R 表达水平的影响

Fig. 4 Effect of compensatory growth on the expression levels of IGF-1 receptor mRNA in muscle tissue

$^*P<0.05$, $n=3$.

极红点鲑(*Salvelinus alpinus*) (Jobling et al, 1993)的雌鱼性成熟比例；延迟异育银鲫(Shen et al, 2003)的卵巢发育；恢复投喂期雌性比雄性个体具有的更明显的补偿效应，可能是由于在补偿生长期个体对能量存储和利用的重新分配(Thorpe et al, 1990)，将用于卵巢发育的营养物质转移到机体生长，加快鱼体生长速度。

目前，鱼类补偿生长的生理机制主要有：提高食物转化率(Dobson & Holmes, 1984)、增加食欲(Calow, 1973)、增加食欲；改善食物转化率(Miglvas & Jobling, 1989)等 3 种观点。异育银鲫通过提高摄食水平和食物转化率来达到补偿生长(Cui et al, 2006; Qian et al, 2000)。各种机制中不同激素的作用可以看作是补偿反应的完整体现。IGF-1 作为重要的生长调节因子，在鱼类生长、发育和中枢神经系统、骨骼肌、生殖器官等组织的功能性成熟中发挥重要作用 (Duan, 1998)。IGF-1 水平同时受到营养状况等诸多因素的调节。大量研究表明，硬骨鱼类的食物代谢和 IGF-1 水平存在相关性，长期饥饿将导致血液中 IGF-1 水平的持续降低(Wood et al, 2005)。然而，产生 IGF-1 水平显著差异的饥饿时间在不同鱼类中差别较大，如鳟鲑鱼类的时间跨度在 4 d～4 周 (Pierce et al, 2005; Wilkinson et al, 2006)。本实验中 IGF-1 水平在饥饿第 14 天显著降低，表明异育银鲫对饥饿的反应速度相对适中。在恢复投喂期内，IGF-1 水平迅速上升至对照组水平，揭示 IGF-1 可能参与异育银鲫的补偿性生长过程。

血清中的 IGF-1 几乎全部与 IGF-1 结合蛋白(IGFBPs)以复合物形式存在，IGFBPs 通过和 IGF-1 结合延长 IGF-1 在血液等组织中的半衰期(Shimizu et al, 2005; Wilkinson et al, 2006)，降低 IGF-1 在血浆中的降解速度，发挥其慢性促生长效应 (Guler et al, 1989; Hodgkinson et al, 1987)。由于 IGF-1 和 IGFBPs 有比 IGF-1 和 IGF-1R 更大的亲合力，IGFBPs 可以作为调节因子控制 IGF-1 和受体的结合，从而影响其生物学功能发挥 (Shimizu et al, 2005; Wilkinson et al, 2006)。本实验中，IGFBP-1 在饥饿期第 14 天表现出与 IGF-1 相似的显著降低状态；然而在恢复投喂期，其水平在第 3 天接近对照组，对恢复营养的反应速度低于 IGF-1，提示 IGFBP-1 和 IGF-1 分泌可能存在不同的调控途径。饥饿引起的营养条件变化对鱼类IGFBP-1的影响已有报道，如禁食 45 d 的鲇鱼(*Ictalurus punctatus*)、30 d 的条纹鲈鱼(*Morone saxatilis*)和 14 d 的大西洋鲑中的低分子量IGFBP水平显著上升，加快分解代谢过程(Hevrøy et al, 2011; Pecterson & Small, 2004; Siharath et al, 1996)。与上述结果不同，本实验中 IGFBP-1水平在饥饿期至恢复投喂第3 天逐渐下降，产生这一现象的原因还需进一步分析。与 IGFBP-1 相比，血液中 IGF-1 水平对营养状况的变化反应更为迅速，因此，可能更适合作为异育银鲫机体营养生理变化的参考指标。

大量研究表明，饥饿条件下鱼类肝组织 IGF-1 mRNA 水平明显下降(Chen et al, 2010; Hua & Lin, 2001)，恢复投喂后，其表达丰度逐渐恢复 (Chauvigné et al, 2003; Duan & Phsetakaya, 1993; Pierce et al, 2005)。本实验结果表明饥饿状态下，异育银鲫血清中 IGF-1 水平伴随 IGF-1 mRNA 水平下降而下降，因此，营养状况对 IGF-1 水平的影响可

能是通过调节 IGF-1 mRNA 的转录水平来实现的(Wood et al, 2005)。在恢复投喂初期(第 1、3 天), IGF-1mRNA 表达量仍继续下降(P<0.05), 对营养条件的变化滞后, 出现降低后升高趋势, IGF-1mRNA 在恢复投喂早期的持续下降在鳟鲑类中也同样存在(Wilkinson et al, 2006)。IGF-1 mRNA 对恢复投喂的反应迟于 IGF-1, 表明营养状况对 IGF-1 水平的影响除调控 IGF-1 mRNA 转录外, 可能还调节 IGFBPs 的含量。

IGF-1 受体通过和 IGF-1 结合促进 IGF-1 跨血管壁运输(Chauvigné et al, 2003), 并通过受体介导的 MAPK 激酶途径和 PI3 激酶等途径得以发挥(Duan, 1998)。研究表明, 虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在恢复投喂后 IGF-1 mRNA 表达水平快速上升, 而 IGF-1R mRNA 则下降或无明显变化(Chauvigné et al, 2003), 其原因可能是 IGFBP-1 抑制了 IGF-1R 的活性(Wood et al, 2005)。本实验中 IGF-1R mRNA 在恢复投喂初期无明显变化, 但在第 14 天时表达水平显著升高, 提示在长时间恢复投喂后, 尽管 IGF-1R 的活性持续受到 IGFBP-1 抑制, 但鱼体可能通过增加 IGF-1R mRNA 的表达量进行补偿。

综上所述, 营养状况影响 IGF-1 的水平。饥饿状态下, 异育银鲫 IGF-1、IGF-1 受体及其结合蛋白出现不同程度下降; 恢复投喂期, 血清 IGF-1 和肝脏 IGF-1 mRNA 均逐渐恢复到正常水平, 而显著高于对照组的 IGFBP-1 水平和 IGF-1RmRNA 表达则通过与 IGF-1 结合以延长 IGF-1 在血液中的半衰期, 以及促进其跨血管壁运输等方式, 提高 IGF-1 的促生长作用, 从而参与异育银鲫补偿生长的调节。因此, 营养状况是鱼类生长轴激素(GH-IGF-1 轴)的重要调节因子。对于鱼类 IGF-1 表达及其血清水平的检测可以较好地反映其营养状况和生长代谢等状态, 有助于从分子和内分泌水平上深入开展鱼类营养与生长调控的研究。

参考文献：

Chauvigné F, Gabillar JC, Weil C, Rescan PY. 2003. Effect of refeeding on IGFI, IGFII, IGF receptors, FGF2, FGF6, and myostatin mRNA expression in rainbow trout myotomal muscle [J]. *Gen Comp Endocrinol,* **132**(2): 209-215.

Chen NS, Zhou J, Jin LN, Zhou HY, Ma JZ, Chou XJ. 2010. Effects of fasting on growth and expression abundance of IGF-1 mRNA in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) [J]. *J Fish Sci,* 17(4): 713-720. [陈乃松, 周洁, 靳利娜, 周恒永, 马建忠, 仇小洁. 2010. 禁食对大口黑鲈生长和肝脏 IGF-I mRNA 表达丰度的影响. 中国水产科学, **17**(4): 713-720.]

Calow P. 1973. On the regulatory nature of individual growth: some observations from freshwater snails [J]. *J Zool,* **170**(4): 415-428.

Cui Z H, Wang Y, Qin J G. 2006. Compensatory growth of group-held gibel carp, *Carassius auratus gibelio* (Bloch), following feed deprivation [J]. *Aquac Res,* **37**(3): 313-318.

Dobson SH, Holmes RM. 1984. Compensatory growth in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson [J]. *J Fish Biol,* **25**(6): 649-656.

Duan CA, Phsetakaya EM. 1993. Nutritional regulation of insulin-like growth factor-1 mRNA expression in salmon tissues [J]. *J Endocrinol,* **139**(2): 243-252.

Duan CM. 1998. Nutritional and developmental regulation of insulin-like growth factors in fish[J]. *J Nutr,* **128**(2): 306S-314S.

Guler HP, Zapf J, Schmid C, Froesch ER. 1989. Insulin-like growth factors I and II in healthy man. estimations of half-lives and production rates [J]. *Acta Endocrinol,* **121**(6): 753-758.

Hevrøy EM, Azpeleta C, Shimizu M, Lanzén A, Kaiya H, Espe M, Olsvik PA. 2011. Effects of short-term starvation on ghrelin, GH-IGF system, and IGF-binding proteins in Atlantic salmon [J]. *Fish Physiol Biochem,* **37**(1): 217-232.

Hodgkinson SC, Davis SR, Burleigh BD, Henderson HV, Gluckman PD. 1987. Metabolic clearance rate of insulin-like growth factor-I in fed and starved sheep [J]. *J Endocrinol*, **115**(2): 233-240.

Hua YM, Lin HR. 2001. Effects of different nutritional status on expression of IGF-1 mRNA in immature common carp liver [J]. *Acta Zool Sin,* **47**(1): 94-100. [华益民, 林浩然. 2001. 营养状况对幼年鲤鱼肝脏 IGF-1mRNA 表达的影响. 动物学报, 2001, **47**(1): 94-100.]

Jobling M, Jørgensen EH, Siikavuopio SI. 1993. The influence of previous feeding regime on the compensatory growth response of maturing and immature Arctic charr, *Salvelinus alpines* [J]. *J Fish Biol,* **43**(3): 409-419.

Jones JI, Clemmons DR. 1995. Insulin-like growth factors and their binding proteins: biological actions [J]. *Endocr Rev,* **16**(1): 3-34.

Kyriazakis I, Stamataris C, Emmans GC, Whittemore C T. 1991. The effects of food protein content on the performance of pigs previously given foods with low or moderate protein contents [J]. *Anim Prod,* **52**(1): 165-173.

Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method [J]. *Methods,* **25**(4): 402-408.

Miglvas I, Jobling M. 1989. The effects of feeding regime on proximate body composition and patterns of energy deposition in juvenile Arctic charr, *Salvelinus alpines* [J]. *J Fish Biol,* **35**(1): 1-11.

Qian X, Cui Y, Xiong B, Yang Y. 2000. Compensatory growth, feed utilization and activity in gibel carp, following feed deprivation [J]. *J Fish Biol,* **56**(1): 228-232.

Peterson BC, Small BC. 2004. Effects of fasting on circulating IGF-binding proteins, glucose, and cortisol in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) [J]. *Domest Anim Endocrinol,* **26**(3): 231-240.

Pierce AL, Shimizu M, Beckman BR, Baker DM, Dickhoff WW. 2005. Time course of the GH/IGF axis response to fasting and increased ration in chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*)[J]. *Gen Comp Endocrinol,* **140**(3): 192-202.

Reimers E, Kjørrefjord AG, Stavøstrand SM. 1993. Compensatory growth and reduced maturation in second sea winter farmed Atlantic salmon following starvation in February and March [J]. *J Fish Biol,* **43**(5): 805-810.

Ren G, Shou JX, Shen WY. 2010. Effects of starvation and refeeding on growth and ovary development in Crucian Carp *Carassius auratus gibelio* [J]. *Fish Sci*， **29**(9): 515-518. [任岗, 寿建昕, 沈文英. 2010. 饥饿和恢复投喂对异育银鲫生长和卵巢发育相关指标的影响. 水产科学, **29**(9): 515-518.]

Shen WY, Zhang LH, Zheng YP, Zhou LQ, Zheng JP. 2003. Effect of starvation on blood composition and ovarion development in *Carassius auratus gibelio* [J]. *Zool Res,* **24**(6): 441-444. [沈文英, 张利红, 郑永萍, 周刘琴, 郑建平. 2003. 饥饿对银鲫血液组分和卵巢发育的影响. 动物学研究, **24**(6): 441-444.]

Shimizu M, Dickey JT, Fukada H, Dickhoff WW. 2005. Salmon serum 22 kDa insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) is IGFBP-1 [J]. *J Endocrinol,* **184**(1): 267-276.

Siharath K, Kelley KM, Bern HA. 1996. A low-molecular-weight (25-kDa) IGF-binding protein is increased with growth inhibition in the fasting striped bass, *Morone saxatilis*[J]. *Gen Comp Endocrinol,* **102**(3): 307-316.

Thorpe JE, Tallbot C, Miles MS, Keay DS. 1990. Control of maturation in cultured Atlantic salmon, *Salmo salar*, in pumped seawater tanks, by restricting food intake [J]. *Aquac,* **86**(2-3): 315-326.

Tudor GD, O'Rourke PK. 1980. The effect of pre- and post-natal nutrition on the growth of beef cattle Ⅱ, The effect of severe restriction in early post-natal life on growth and feed efficiency during recovery [J]. *Aust Agric Res,* **31**(1): 179-189.

Turchini GM, Francis DS, De Silva SS. 2007. Finishing diets stimulate compensatory growth: results of a study on Murray cod, *Maccullochella peelii peelii* [J]. *Aqua Nutr,* **13**(5): 351-360.

Wilkinson RJ, Porter M, Woolcott H, Longland R, Carragher JF. 2006. Effects of aquaculture related stressors and nutritional restriction on circulating growth factors (GH, IGF-I and IGF-II) in Atlantic salmon and rainbow trout [J]. *Comp Biochem Physiol A: Mol Integr Physiol,* **145**(2): 214-224.

Wood AW, Duan CM, Bern HA. 2005. Insulin-like growth factor signaling in fish [J]. *Int Rev Cytol,* **243**: 215-285.

～～

（上接第 270 页）

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 304−313 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03304

文昌鱼 GFP 基因的鉴定及表达分析

徐 炜, 李伟业, 王义权*

（厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005）

摘要：近年在隶属头索动物亚门的文昌鱼体内发现有内源性绿色荧光蛋白存在，并发现文昌鱼荧光蛋白的发光现象在不同发育时期以及个体间有较大的差异。为了进一步揭示 GFP 基因在文昌鱼中的进化模式，探索其可能执行的功能, 该文首先对白氏文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*）GFP 基因作了全面鉴定，并对其不同发育阶段胚胎及成体不同区域中的荧光信号进行了实时观察记录，进而对 GFP 基因在绿色荧光表达强烈的两个特定时期做了绝对定量检测。研究结果表明，文昌鱼基因组中至少有 12 个内源性 GFP 基因, 在个体发育的不同时期，内源性荧光出现的位置有所变化, 而且在变态后的个体之间出现荧光的情况差异较大, 荧光蛋白基因的表达由多个 GFP 同源基因共同参与, 这些基因在不同的发育时期表达量有较大的差异, 提示不同的 GFP 基因在特定发育阶段可能行使各自的功能。

关键词：文昌鱼; GFP; 基因克隆; 表达
中图分类号：Q959.287; Q344.13; Q951 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0304-10

Identification and expressional analysis of green fluorescent protein genes in amphioxus

XU Wei, Li Wei-Ye, WANG Yi-Quan*

(*School of Life Sciences*, *Xiamen University*, *Xiamen* 361005, *China*)

Abstract: Endogenous green fluorescent proteins (GFPs) have recently been found in amphioxus, where different characteristics of light production in different development stages and between different individuals have manifested. We identified the GFP genes in an amphioxus species *Branchiostoma belcheri* and monitored real time fluorescence signals of GFPs during different developmental stages to provide an insight on the GFP function in amphioxus. We found there are at least 12 endogenous GFP genes in amphioxus genome, and fluorescent expression changes in body position during different developmental stages. Additionally, GFP expression after metamorphosis development differed significantly among different amphioxus individuals, suggesting that there are multiple GFP homologous genes responsible for fluorescent expression. Expression levels of these genes varied significantly during different developmental stages, indicating that different GFP genes may have their unique functions in the development of amphioxus during specific phases of growth.

Key words: Amphioxus; GFP; Gene clone; Expressional

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)作为常用的分子标记蛋白已广泛应用于细胞生物学、发育生物学、分子生物学等生物学研究的各个领域, 尤其在 2008 年诺贝尔化学奖授予在 GFP 技术上有突出贡献的三位科学家后，GFP 越来越为大家所熟知。当前对 GFP 基因家族的研究一方面集中在化学家对 GFP 的改造优化和拓展它们的应用领域, 通过对发色基团形成分子机制的探索，改变其在生化和光谱学上的性质以及适用的灵敏度和范围, 改造出增强型的荧光蛋白衍生物用来作为分子标记, 进一步加深人们对绿色荧光蛋白家族的结构与功能间相互关系的认识; 另一方面进化生物学家和海洋生物学家则积极探索自然界存的尚未发现的荧光蛋白家族新成员以及有内源荧光蛋白的物

收稿日期：2012-01-11；接受日期：2012-04-10
基金项目：国家自然科学基金项目(30830023；31071110)
*通信作者(Corresponding author)，王义权(1957 一), 男, 教授, 博士生导师, 研究方向：动物分子遗传与进化。E-mail: wangyq@xmu.edu.cn

种，对新发现荧光蛋白家族的成员进行系统发育分析，期待能够对 GFP 基因家族的起源进化以及生理功能作进一步预测，从而加深对 GFP 生物学功能的了解。

GFP 最早是 Shimomura et al (1962)在研究太平洋维多利亚水母(*Aequoreavitofia*)的荧光素酶时意外发现的一种能够自发释放出生物荧光的蛋白质。Morise et al (1974)纯化了该蛋白质。在水母中分离得到的这种 GFP 是由 238 个氨基酸组成的一种单体蛋白质，其中 GFP 荧光的产生主要归功于其分子内 65～67 位(SYG)的三个氨基酸所形成的生色团。随后的研究发现，GFP 的晶体结构显示蛋白质中央是一个水桶样结构，由 11 个围绕中心 α 螺旋的反平行 β 折叠组成的一个完整结构，这个桶状结构的完整性是 GFP 产生荧光的前提条件。GFP 家族的成员其生色/荧光基团的形成完全是由多肽链序列本身决定，其成熟以及荧光发射除了氧气外，都不需要其他任何辅助因子 (Ormö et al,1996; Tsien, 1998; Yang et al,1996; Zimmer, 2002)。自从 1992 年 Douglas Prasher 在水母中克隆得到第一个 GFP 基因 *av*GFP 后，许多新的 GFP 基因也陆续在其他物种得到克隆(Chalfie et al, 1994; Gurskaya et al, 2003; Labas et al, 2002; Matz et al, 1999; Shagin et al, 2004)。这些 GFP 基因主要来自后生动物的两大类：刺细胞动物(Cnidarians)和桡足类(Copepods)，而在已经测序的其他后生动物中却尚未找到 GFP 基因。

Deheyn et al (2007)在头索动物佛罗里达文昌鱼(*Branchiostoma floridae*)中发现一个 GFP 基因，而且在这个物种胚胎发育的各个时期及成体中都发现了绿色荧光蛋白表达。随后进一步的系统发育分析暗示，文昌鱼 GFP 的起源符合先前关于两侧对称动物的荧光蛋白是从单一的后生动物祖先的荧光蛋白进化而来的推测，而不是独立源于后口动物的 G2FP 基元蛋白(Shagin et al, 2004)。目前在 RCSB 蛋白数据库中已收集的 27 个物种中发现有 266 个 GFP 基因家族的成员。该数据库对这些基因的空间结构等方面有详细的描述，人们对这些 GFP 基因进行了系统分析，并对 GFP 的功能作了一些推测；但很遗憾，RCSB 数据库中没有包含头索动物文昌鱼的 GFP 基因数据(Ong et al, 2011)，而文昌鱼作为发现内源 GFP 蛋白的最高等生物类群，对其 GFP 的研究有着重要意义。作为隶属脊索动物门(Chordata)头索动物亚门(Cephalochordata)的文昌鱼，在进化上占有极其重要的地位，是介于无脊椎动物和脊椎动物之间的过渡类型 (Holland et al, 2004)。由于文昌鱼本身具有结构简单、个体小、躯体透明、体外受精发育，以及其基因组排布与脊椎动物基因组的同线性程度高，且具有较少重复,使它成为一种非常理想的模式生物，已经越来越多地被人们应用于进化发育生物学和比较与功能基因组学等方面的研究 (Theodosiou et al, 2011) 。得益于文昌鱼实验室繁殖成功（Wang et al，2006），我们可以对白氏文昌鱼 GFP 基因进行鉴定和克隆，并对绿色荧光表达较强烈的口笠触须和胚胎时期的 GFP 基因表达进行绝对定量检测，结合体视镜观察文昌鱼不同发育时期的荧光蛋白表达，以期找出 GFP 基因在不同时期和位置表达上的差异，从而为进一步了解文昌鱼 GFP 功能作一些预测。此外，文昌鱼作为一种新兴的模式生物，在以后的研究中 GFP 很可能作为报告基因用来研究外源基因表达和功能。然而，文昌鱼中存在着大量的内源性 GFP 基因，这样就很有可能影响绿色荧光蛋白报告基因的使用，因此，对于文昌鱼内源性 GFP 的表达规律和光谱学等一系列特性的了解，有助于我们更好地选择合适的荧光蛋白报告基因进行以后的研究工作。

1 材料和方法

1.1 白氏文昌鱼的成体以及胚胎收集

本实验采用厦门产白氏文昌鱼(*Branchiostoma becheri*)的成体和胚胎作为材料(Zhang et al, 2006)，文昌鱼亲鱼于 2009 年 3 月采集自厦门欧厝和黄厝海滩，经一年饲养，通过控制合适的光照使其正常产卵，在 2010 年 6 月中旬到 8 月的文昌鱼产卵季节分别收集文昌鱼的胚胎，于 Trizol 中研磨，随后将样品分装再冻存于−80 ℃备用。用 OLMPUS 荧光体视镜对白氏文昌鱼成体进行观察，以找出在头部口笠处绿色荧光表达强烈的个体，将其口笠切下保存到 Trizol 中。此外，对白氏文昌胚胎发育过程观察发现，神经胚出膜后 6～8 体节，胚胎开始出现较强的绿色荧光。

1.2 RNA 提取和反转录

对解剖所得口笠组织以及出膜后 6～8 体节的 Trizol 样品，进行 RNA 抽提，方法参照动物组织 Trizol 样品的 RNA 提取方法，得到的总 RNA 用 DNase (TAKARA 公司)处理，去除可能残存在的基因组 DNA 污染，避免其对以后 qPCR 实验结果的影

响。所得 RNA 经 1%的琼脂糖凝胶电泳检测其完整性，再用微量分光光度计测定 A_{260} 和 A_{280} 值，检测 RNA 的纯度，并计算浓度，所得 RNA 的 A_{260}/A_{280} 比值均在 1.8～2.0。最后使用反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT Kit (TOYOBO 公司)将提取的 RNA 进行反转录合成 cDNA，用于后期的 qPCR 分析实验。

1.3　白氏文昌鱼 GFP 基因的鉴定

我们筛选得到的文昌鱼 GFP 序列来自白氏文昌鱼基因组数据库。使用的方法是：将已报道的佛罗里达文昌鱼的 GFP 蛋白序列作饵(Li et al, 2009)，用 blast 方法中的 tBlastn 程序(E-value=1 e^{-5}) (Altschul et al, 1990)将所有白氏文昌鱼的 GFP 基因从基因组中定位出来，通过在线软件 mVISTA (网站 http://genome.lbl.gov/vista/index.shtml)预测未注释基因的 cDNA 序列。再比较每个注释 GFP 基因 CDS 上下游各 3 000 bp 的基因组序列差异来校正，从而确定所注释的基因是否为等位基因。

1.4　GFP 基因的克隆

通过 MEGA4.1 对所得到的 GFP 基因序列进行比对，根据比对结果设计特异性引物，对 GFP 基因完整蛋白编码区的 cDNA 序列进行扩增。扩增所得的 PCR 产物通过电泳检测，对在 650～850 bp 的条带进行切胶回收，回收的片段连接到 PGEM-T easy 载体(Promega 公司)，转化入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞克隆。将得到的阳性克隆送到华大基因公司测序，测序结果用 BIO-EDIT 和 DNA-STAR 软件进行分析，将测序所得到的序列在 GenBank 中比对，随后将那些确定的 GFP 基因序列与基因组数据库中预测到的 GFP 基因的编码序列再次进行比对验证。

1.5　GFP 基因实时荧光定量 PCR 引物设计及特异性检验

测序所得到的白氏文昌鱼 GFP 蛋白编码区序列，用 MEGA4.1 比对，在各个 GFP 间序列差异度较大的位置设计每个基因特异的 qPCR 的引物，以排除不同 GFP 基因间的相互干扰而影响实验结果。然后依次以含有不同 GFP 基因的重组质粒为模板，进行 PCR 扩增，扩增产物经 1.0%琼脂糖电泳来检测 qPCR 引物的特异性，从而避免不同的 GFP 基因在试验中出现交叉反应，影响绝对定量结果。

1.6　荧光定量 PCR 标准曲线的建立及重现性检测

将经验证含有不同 GFP 基因序列的阳性克隆，加入 4 mL 含 Amp 的 LB 液体培养基中 37 ℃，180 r/min 摇床过夜，提取重组质粒，用微量紫外分光光度计测定所提取质粒的吸光度(A_{260} 和 A_{280} 值)，以此计算提取的质粒浓度和判断质粒纯度。再根据摩尔定律，计算质粒中的 DNA 拷贝数。以标准质粒的 10^8 拷贝往下依次 10 倍梯度稀释至 10^2 拷贝为绝对定量模板，得到 7 个浓度梯度，然后进行荧光定量 PCR。在每次实验过程中同时设置无模板的阴性对照，每个样品重复 3 次，反应在 Qiagen 公司的 Rotor-Gene 6000 定量 PCR 仪上进行，qPCR 扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳进行验证，以确保实验的准确性。荧光定量 PCR 反应结束后制作溶解曲线，阈值设置选择曲线指数扩增的线性阶段且精度最大敏感性最大的区域，建立标准曲线(Giulietti et al, 2001)。

1.7　文昌鱼生长发育过程中的荧光观察

在产卵季节收集文昌鱼的卵细胞和受精卵分别放入直径 30 mm 的培养皿中，用 Olympus 荧光体视镜观察记录不同批次文昌鱼的受精卵发育过程的绿色荧光，同样观察成体不同组织或器官的绿色荧光的变化，从而找出绿色荧光蛋白在文昌鱼发育阶段的表达规律，加深了解文昌鱼体内绿色荧光蛋白表达谱的变化。在对文昌鱼胚胎从受精卵发育到 36 h 幼体的发育过程中，分 3 个不同的批次进行观察，每次观察超过 50 枚胚胎，分别在白光和绿色荧光的情况下对胚胎进行拍照，拍摄间隔为 30 min，然后保存图片。对于 36 h 幼体到 10 d 幼体，则是每天 1 次，每次观察拍摄的数量不少于 5 尾，对于 10 d 后的幼体则每 5 天 1 次直到幼体完成变态，进行观察记录。变态完全的幼体，每 15 天观察记录 1 次，而成体文昌鱼的荧光情况是分 3 批在不同时间统计 50 条文昌鱼的荧光表达情况来进行分析。

2　结　果

2.1　白氏文昌鱼 GFP 基因的鉴定克隆

通过用 Bf-GFP 的蛋白序列为饵在白氏文昌鱼基因组数据库中使用 tBlastn 方法获得 24 个与 GFP 基因相关的序列和片段的 scaffold，然后用 mVISTA 等软件预测这些 scaffold 中的 GFP 基因，通过对所得 GFP 基因上下游序列进行分析，人工校正预测结果，得到 12 个有功能的 GFP 基因的全长 CDS 序列。经过鉴定的 12 个 GFP 基因分布在 8 个 scaffold 上，其中 4 个 scaffold 上都存在着 2 个 GFP 基因，这些

基因所占据的区域最大不超过 5 kb, 一般都在 3 kb 左右。每个 GFP 基因都含有 6～7 个外显子和 5～6 个内含子, 它的编码区长度在 651～666 bp 之间, 编码 217～222 个氨基酸, 与在桡足类发现的 GFP 基因大小较为一致, 但却比在水母中发现的 GFP 基因的长度要略微短一些。这些基因大小的变化都在编码区的第 3 和第 6 个外显子中, 差异在 3～12 bp 之间不等, 这与 Li et al（2009）对佛罗里达文昌鱼 GFP 基因结构和蛋白长度保守的分析的结果是一致的。依据鉴定得到的 GFP 基因序列设计特异引物, 以文昌鱼不同发育时期的 cDNA 为模板, 用 RT-PCR 的方法, 扩增得到其中 10 个 GFP 基因的蛋白编码区全长序列(除了 *Bb-GFP11* 和 *Bb-GFP12*), 并将其用于文昌鱼 GFP 基因的表达量分析。由于目前对文昌鱼 GFP 基因还没有统一的命名规则, 我们选择 Li et al (2009)使用的命名方法对白氏文昌鱼 GFP 基因进行命名。在随后的蛋白序列比对和系统进化分析中, 采用的 Bf、Bj、Bl 的 GFP 蛋白序列都来自 Li et al (2009)分析头索动物 GFP 蛋白进化中所使用的蛋白序列。我们比对分析了现有文昌鱼 GFP 蛋白的序列(图 1), 发现它们蛋白序列保守性很强, 文昌鱼 GFP 大多具有完全相同的发色基团, 即甘氨酸-酪氨酸-甘氨酸。

2.2　文昌鱼 GFP 基因的进化关系

为了了解 4 种文昌鱼 GFP 基因的进化关系, 同时对比有全基因组数据库支持的两种文昌鱼 *B. floride* 和 *B. becheri* GFP 基因家族在进化上的差异, 我们以桡足类和刺胞类 GFP 基因作为外群，结合所有已知文昌鱼 GFP 的蛋白序列构建了 NJ 树（图 2)(Saitou & Nei, 1987)。系统进化树显示文昌鱼 GFP 基因可以分成不同的 6 簇(自展值分别为 99、100、97、100、100、100)，不同簇中的 GFP 基因的数目也不一样。所有佛罗里达文昌鱼的 14 个 GFP 基因分布在 5 个簇里(除了 clade5)；欧洲文昌鱼的 6 个 GFP 基因全部位于簇 1；日本文昌鱼的 3 个 GFP 基因则分布在 3 个簇中(clade1, clade2, clade5)；而白氏文昌鱼的 12 个 GFP 基因分布在 5 个簇里(除了 clade4)。在进化树中我们发现欧洲文昌鱼没有能与其他 3 种文昌鱼 GFP 基因形成可靠的直系同源关系, 而对其他 3 种文昌鱼的直系同源关系分析也仅在簇 1(*Bf-GFP7*、*Bb-GFP7* 和 *Bj-GFP7*), 簇 2(*Bf-GFP9*、*Bb-GFP9* 和 *Bj-GFP9*)和簇 3(*Bf-GFP10* 和 *Bb-GFP10*)中看到有 3 对 GFP 基因具有可靠的直系同源关系, 而其他的 GFP 基因则也没有与簇里的基因形成可靠的直系同源关系。

在进化树中可以很明显地看到两种有完整基因组数据库支持的文昌鱼 *B. floride* 和 *B. becheri* 的 GFP 基因不仅数量存在差异, 而且在分布上也有差别, 这两种文昌鱼的 GFP 基因都只分布于其中的 5 簇中。在不同的簇之间, Bb-GFP 和 Bf-GFP 之间的数目也是不尽相同的。另外，*B. floride* 和 *B. becheri* 各有 1 簇自己特有的 GFP 基因。*B. becheri* 特有的 GFP-clade5 只有 1 个基因，该基因在两种西太平洋文昌鱼中均存在，但在 *B. floride* 则没有发现。 *B. floride* 的 GFP-clade4 基因的数量高达 3 个，但在 *B. becheri* 中则没有这簇基因。以上对 *B. floride* 和 *B. becheri* 的 GFP 基因分析的结果暗示，不同种文昌鱼含有的 GFP 基因数量不同, 并不是每种文昌鱼都含有完整的 6 簇 GFP 基因,；不同种文昌鱼在各簇中的 GFP 基因数目也不完全相同。这些可能与文昌鱼分化以后，各自在所处的生活环境中承受的选择压力差异有关。

2.3　文昌鱼 GFP 基因实时引物的特异性检测

由于文昌鱼 GFP 基因可能由独立的一个祖先基因倍增而来, 通过 Sequencher 4.2 对其进行序列比对, 发现它们的 CDS 序列相似度较高, 有的基因间相似度在 98%以上(如 *Bb-GFP 5* 和 *Bb-GFP 6*), 因此，需要我们在设计 GFP 基因的 qPCR 引物时进行引物的特异性检测, 尤其注重那些隶属于同一簇内且序列相似度极高的 GFP 引物检测。在 Bb-GFP 基因家族中，Bb-clade1 亚家族和 Bb-clade3 亚家族含有较多基因，而且基因间序列相似度较高。从 Bb-clade1 亚家族中克隆到 4 个基因的全长编码区序列，Bb-clade3 亚家族中的克隆到 3 个基因(除了 *Bb-GFP12*)。对扩增这 7 个基因的引物特异性进行检测, 结果显示这 7 对引物特异性较好, 没有在含有其它 GFP 全长序列的质粒中出现引物间的非特异性扩增, 这就避免了特异引物间的交叉反应, 确保后期 qPCR 实验结果的准确性。

2.4　荧光定量 PCR 标准曲线及可重复性检测

用带有目的片段全长序列的质粒稀释样品作为各组定量实验标准品, 荧光定量 PCR 后, 根据标准曲线法设定阈值, 取线性关系良好的加样孔，用 Rotor 6000 荧光定量 PCR 仪上自带的绘图软件绘制标准曲线。根据图像显示 SYBR Green I PCR 标准曲线的阈值和模板的浓度显示很好的线性关系,

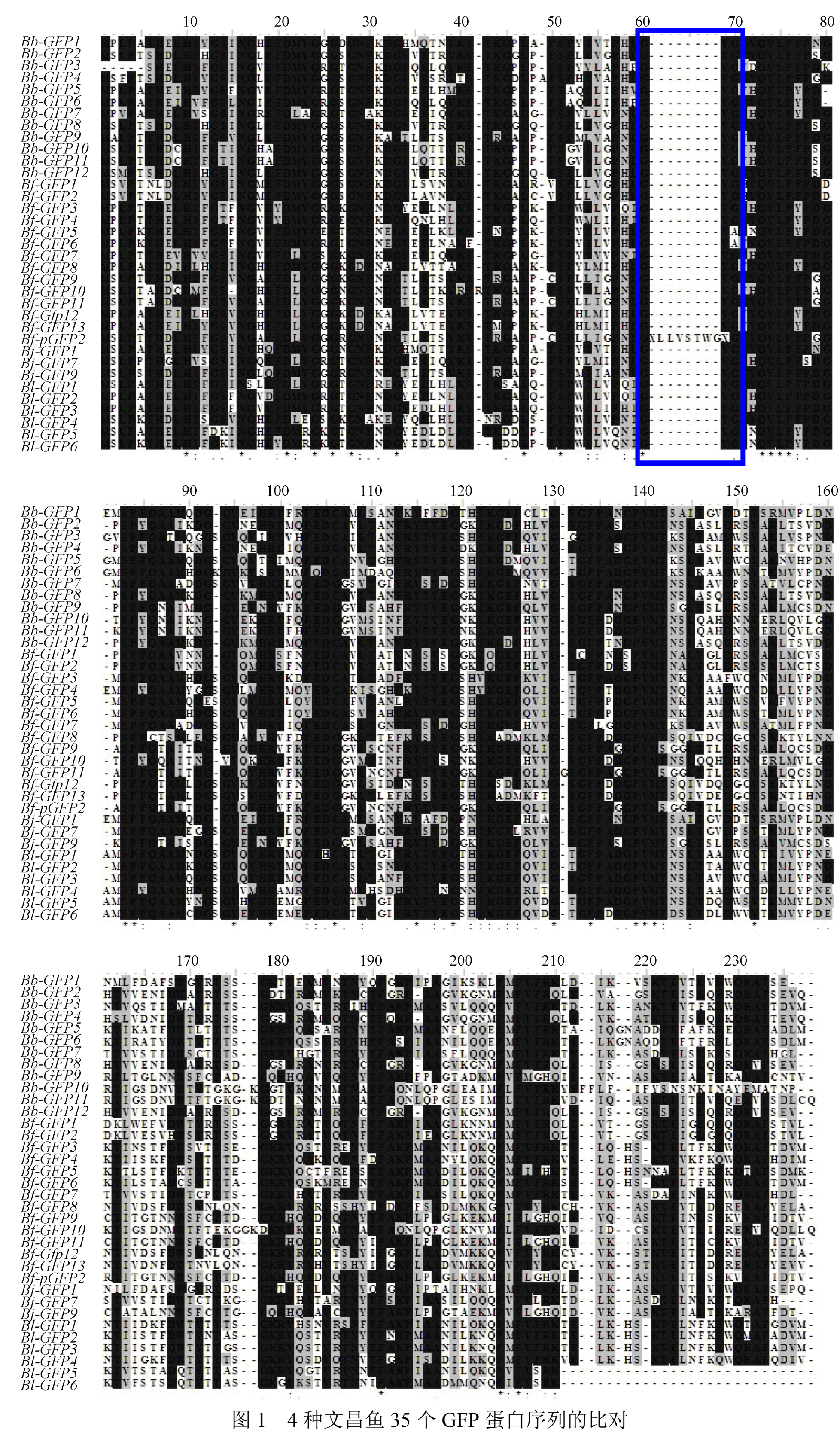


图 1　4 种文昌鱼 35 个 GFP 蛋白序列的比对

Fig. 1　Alignment of 35 GFP protein sequences in four Amphioxus species

蓝颜色框里的是三肽发色基团 (Tripeptide chromophores are marked with a blue box)。

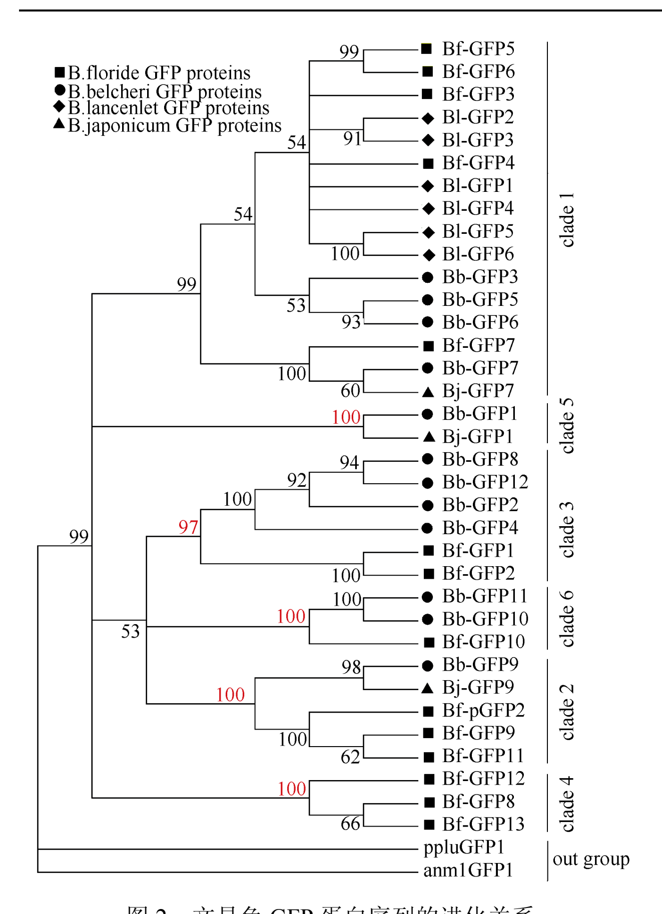


图 2　文昌鱼 GFP 蛋白序列的进化关系

Fig. 2　Phylogenetic relationship of GFP protein sequences in amphioxus

系统进化树由邻接泊松距离法构建，1 个刺细胞动物和 1 个桡足类动物的 GFP 序列被用于外群，树图上显示对于不同 GFP 的分类和简称见图上的注释。

The GFP Phylogenetic tree was reconstructed by neighbor-joining method with protein Poisson distances. The sequences from *Cnidaria* and *Copepoda* were used as outgroup. Bootstrap percentages over 50% were shown on the interior branches.

所使用 GFP 序列的序列号如下(GenBank identities for *GFP* genes are as followed)：anm1GFP1, AY485334; ppluGFP1, AY268071; *Bl-GFP1*, EU482388; *Bl-GFP2*, EU482390; *Bl-GFP3*, EU482393; *Bl-GFP4*, EU482400; *Bl-GFP5*, EU482404; *Bl-GFP5*, EU482404; *Bl-GFP6*, EU482405.

10 条曲线的 R^2 值都大于 0.980，说明标准曲线建立成功。

本实验中 PCR 的检测灵敏度在 10^2～10^3 拷贝/μL，对于实验的重复性，我们采用了 *cv* 方法进行重现性评价，各个引物之间荧光定量PCR的结果排除在实验过程中操作上的失误，出现的误差很小，变异系数 1.6%，说明各组的荧光 PCR 实验结果具有较好的稳定性和重复性，从而保证了不同样品检测结果的可靠。

2.5　白氏文昌鱼 GFP 基因的表达谱分析

我们对扩增到完整编码区序列的 10 个白氏文昌鱼 GFP 基因在最先有荧光出现的幼鱼 6～8 体节时期、以及荧光信号强烈的成体口笠组织中 GFP 基因的表达进行了定量分析。

2.5.1　GFP 基因在口笠触须中表达的分析　以所得文昌鱼强烈表达荧光的口笠组织cDNA为研究对象，对 10 个 GFP 基因的表达量进行分析(图 3)，结果显示该时期 10 个 GFP 基因均有表达，但各个基因在该时期的表达丰度差异较大，在 1.4×10^2～1.7×10^5 拷贝/微升之间，其中 *Bb-GFP7* 的表达量最高，而 *Bb-GFP9* 最低，差异达到 1 307 倍。分析发现在该组织中表达丰度较高的 GFP 基因依次为 *Bb-GFP7*、*Bb-GFP3*、*Bb-GFP10*、*Bb-GFP5* 共 4 个 GFP 基因，占该组织中 GFP 基因表达总量的 97.6%，其中 *Bb-GFP7* 的表达量最高，约占到总量的 57.6%，其它 GFP 基因表达量相对较低。

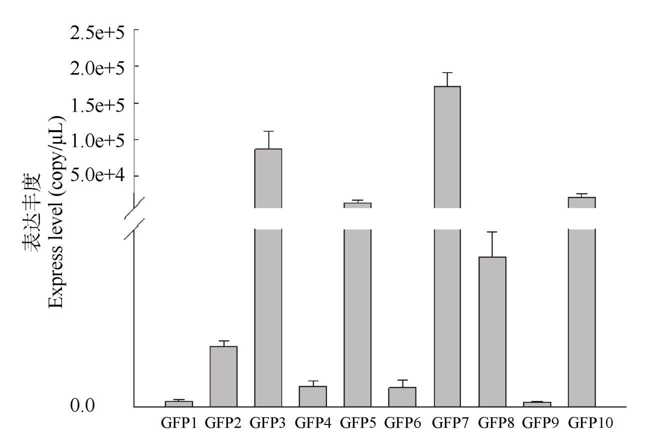


图 3　口笠组织中各 *Bb-GFP* 基因的表达丰度

Fig. 3 Abundance of *Bb-GFP* gene expression on the oral cirri

2.5.2　GFP 基因在 6～8 体节幼体中表达的分析　以刚开始表达荧光的 6～8 体节幼体 cDNA 为分析对象，对 10 个 GFP 基因的表达量进行分析(图 4)，结果显示该时期 10 个 GFP 基因同样均有表达，但各个基因在该时期的表达丰度差异较大，基因的表达量是在 1.5×10^2～6.2×10^5 拷贝/μL 之间，其中 *Bb-GFP10* 的表达量最高，而 *Bb-GFP9* 最低，差异最高达 4 133 倍。分析发现表达量较高的主要是 *Bb-GFP10* 和 *Bb-GFP6*。这 2 个高表达的 GFP 基因，占该组织中 GFP 基因表达总量的 96.0%，其中 *Bb-GFP10* 的表达量约占到总量的 79.3%，而其它 GFP 基因则表达量相对较低。

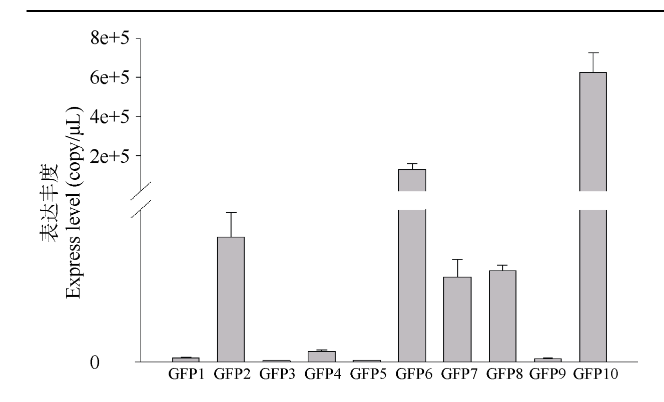


图 4　6~8 体节各 *Bb-GFP* 基因的表达丰度
Fig. 4　Abundance of *Bb-GFP* gene expression on 6-8 somite stages

2.6　绿色荧光在文昌鱼发育时期的变化

为了解不同发育时期文昌鱼绿色荧光的表达规律, 我们用荧光体视镜详细地观察了白氏文昌鱼从刚产出的卵到受精后发育至成体的绿色荧光蛋白表达情况(表 1)。发现文昌鱼卵受精前后均观察不到绿色荧光, 受精卵发育至神经胚早期也没有绿色荧光出现; 神经胚发育至后期, 出膜后的 6～8 体节时期, 在镜下可观察到此时的神经胚发出绿色荧光(77.8%个体会出现), 当发育至 11～13 体节时期, 此时的神经胚已显著延长, 可见全身遍布绿色荧光，而且所有个体都可以见到绿色荧光，只是强弱略有差异; 在 36 h 幼体(3 鳃裂刚开始形成)中绿色荧光呈现不规则分布, 随着个体生长发育, 绿色荧光向身体的前端集中; 幼体发育至第 9 天, 已出现了 5 个鳃裂, 此时在回节环前开始出现较强的绿色荧光(34.2%个体出现)；至第 20 天, 幼体已有 8 鳃裂时, 所有个体在回节环前都出现强烈的绿色荧光, 回节环前的绿色荧光伴随着幼体, 直到幼体变态钻沙, 随着幼体变态的完成，回节环前的绿色荧光才逐渐减弱；完成变态后的亚成体文昌鱼中有 70.8%在口笠处出现较强的绿色荧光, 这种绿色荧光一直伴随着其生长发育。为了对成体文昌鱼的荧光表达

表 1　文昌鱼生长发育各时期荧光表达情况统计
Tab. 1　Statistics of amphioxus individuals with fluorescence expression at different developmental stages

发育时期 Developmental stage	观察总数(个) Total number of amphioxus individuals	荧光强烈表达个体数 Number of individuals with strong fluorescence	荧光微弱表达个体数 Number of individuals with weak fluorescence	无绿色荧光个体数 Number of individuals with no fluorescence	荧光强烈表达个体比例 Proportion of individuals with strong fluorescence (%)
未受精卵 Eggs	176	0	0	176	0
受精卵 Fertilized eggs	247	0	0	187	0
2-16 cell	236	0	0	236	0
32-128 cell	208	0	0	208	0
原肠胚期 Gastrula period	187	0	0	187	0
神经胚期 Neurula stage	157	0	0	157	0
6-8 体节时期 6-8 somites stage	208	105	63	40	50.4
11-13 体节期 11-13 somites period	184	143	41	0	77.8
36 h 幼体 36 h larvae	51	51	0	0	100
3 鳃裂时期 3 gill slits stage	32	32	0	0	100
5 鳃裂时期 5 gill slits stage	35	35(12)*	0	0	100(34.2)
8 鳃裂时期 8 gill slits stage	43	43(43)	0	0	100(100)
37 天变态初期幼鱼 37 days initial metamorphosis larval	37	37(37)	0	0	100(100)
50 天变态完全幼鱼 50 days complete metamorphosis larvae	24	17(14)	7(10)	0	70.8%(58.3%)
86 天亚成体 86 days of Sub-adult	15	6 (0)	9(0)	0(15)	40%(0)
成体 Adult	150	83	67	0	59.2%

*为 5 鳃裂时期到 86 天亚成体的文昌鱼幼鱼在回节环前段出现了强烈表达的绿色荧光, 小括号中的数字代表的是在回节环前端绿色荧光的表达情况。
*: 5 gill slits larvae to 86 sub-adult amphioxus both appeared a strong expression of green fluorescence in the front of the ring. The data of green fluorescent expression in these special areas is represented in parentheses.

情况有个清楚的了解，我们随机选取了 3 批各 50 条成体文昌鱼的荧光表达情况进行观察统计，发现白氏文昌鱼的绿色荧光主要集中在前段，其中荧光表达强烈的位置主要是口笠的基部和触须处，口笠表达强烈绿色荧光和不强烈荧光的比例近似为 6∶4，未发现口笠处完全没有绿色荧光的成体文昌鱼。

3 讨　论

自从 40 年前人们克隆了 *av*GFP 以后，对这个独特家族成员的研究就没有停息，目前对 GFP 荧光发生中起决定作用的生色团形成、光谱学性质和调控的分子机制等生化和光物理学性质已有了较深入的了解。GFP 理化性质上的研究进展及其本身应用的广泛性，使人们对它在起源进化以及功能上的一系列问题产生了浓厚的兴趣。目前很多与 GFP 基因相关的研究成果主要集中在海鞘和桡足类动物的 GFP 上，文昌鱼 GFP 基因的研究工作却没有真正的开展，而作为唯一一个在后口动物体内发现绿色荧光蛋白的文昌鱼，本身就是一个十分令人不解的问题。Deheyn et al (2006)在对 GFP 进化分析时认为，GFP 基因这种在动物界中的稀有且离散分布，可能暗示它与后生动物类群中其他由 11 个标准 *a*-螺旋所构成的 *β*-桶状超蛋白家族有着某些内在的联系，这些蛋白也许并不为我们所熟知，它们只是起着各自的功能，自身也没有耀眼的荧光，例如大多数后生动物细胞外基质重要组成部分的 G2FP 基元蛋白。

先前 Li et al (2009)已经在 3 种不同的文昌鱼体内都发现了 GFP 基因，虽然在具有完整的基因组数据库支持的佛罗里达文昌鱼发现了 13 个 GFP 基因和 2 个假基因，但是欧洲文昌鱼和日本文昌鱼都只得到了少量的 GFP 基因的数据，以致无法对不同种文昌鱼 GFP 基因的直系同源关系给予一个明确的回答，同时也缺乏足够的数据对文昌鱼内的 GFP 基因作一个较完整的系统进化分析。我们在对白氏文昌鱼基因数据库中分析鉴定得到了 12 个 GFP 基因家族的成员，这与 Baumann et al (2008)和 Bomati et al (2009)在对佛罗里达基因组数据库分析时发现的迄今为止最大 GFP 基因家族的结果一致，说明作为唯一一个在后生动物谱系中发现 GFP 基因的物种文昌鱼体内自身确实存在大量的 GFP 基因。随后我们对所有已知的文昌鱼 GFP 进行了系统进化分析，将文昌鱼的 GFP 分为 6 簇，发现已知的 4 种文昌鱼中 GFP 家族并不存在完整的 6 个基因簇，而且不同簇内 GFP 基因的数目也不相同，由此推断现存各种文昌鱼 GFP 基因的多样性是由一个文昌鱼 GFP 基因祖先通过串联倍增来实现的，现存不同种文昌鱼 GFP 基因家族在种间和种内各簇基因数目差别是在后面各自独立的进化过程中发生倍增丢失才出现的，文昌鱼 6 簇 GFP 基因的祖先是在现存所有文昌鱼祖先分化以前就已经存在了。

我们在对 4 种文昌鱼 GFP 基因的蛋白序列比对时发现它们都很显示很高的保守性，而且 *B.b-GFP* 基因的结构和 *B.f-GFP* 基因的结构相同，都是 6~7 个外显子和 5~6 个内含子，每个外显子的大小几乎也都完全相同，这种结构和序列长度上的保守性进一步暗示文昌鱼 GFP 在进化过程中曾受到非常强的选择压力，提示它们在文昌鱼进化过程中可能起着非常重要的作用。通过对两种有基因组数据支持的文昌鱼 GFP 基因结构以及随后的系统进化分析，我们可以更加确定这些 GFP 基因都是来自一个共同的祖先，而不是来自于物种间的水平转移。另外，在对白氏文昌鱼 GFP 和 Li et al.(2009)先前报道的 3 种文昌鱼 GFP 保守的三肽发光基团比较发现，*Bb-GFP* 并没有 *Bf-GFP* 所特有的甘氨酸-酪氨酸-丙氨酸这一特异发色基团。Delagrave et al (1995)和 Wall *et al* (2000)的研究结果显示第 3 位的甘氨酸在三肽发色团的形成中起着重要的作用，而且在之前所有自然的和人工合成荧光蛋白分析都没有非 XXG 三肽结构发色基团。对有完整基因组数据库支持的 *Bb-GFP* 基因家族的蛋白序列分析结果，进一步明确了 GYA 三肽发色基团是佛罗里达文昌鱼所特有。由此说明，文昌鱼最初的 GFP 并没有在第三个位点是丙氨酸的发色基团，佛罗里达文昌鱼所出现特异发色基团 GYA 可能是在文昌鱼种群分化以后突变的结果。文昌鱼 GFP 蛋白序列在总体上的差异不大，而且几乎所有已知的海鞘和桡足类、以及绝大多数文昌鱼的 GFP 三肽发色集团都是 XYG 结构，但是佛罗里达文昌鱼却在产生荧光起决定作用的发色基团上出现了 GYA 的三肽突变结构，同样也值得我们去深究。

本研究中我们用 RT-PCR 方法在文昌鱼的不同发育时期和不同组织的 cDNA 扩增的到 10 个 GFP 基因的完整蛋白编码区序列，并对这 10 个 GFP 基因在最先有荧光出现的 6~8 体节时期胚胎，以及口笠处荧光表达强烈的成体文昌鱼口笠组织中的表

达量进行分析。结果显示每种 *Bb-GFP* 基因在文昌鱼的不同发育时期都有表达, 其中大多数 GFP 基因在文昌鱼体内的表达量较低, 但是这些 GFP 基因的表达量并不是一成不变的。那么各种 GFP 基因在不同时期的文昌鱼体内表达量变化呈现什么样的规律，尽管我们对这种变化的认识还不是十分清楚, 但是在对以上两个特殊时期 GFP 基因表达量发现高表达的 GFP 基因只有 2~4 个, 却占到 GFP 基因表达总量的 96%以上。这与 Bomati et al (2009)和 Li et al (2009)分析佛罗里达文昌鱼不同时期(未受精卵, 胚胎和成体)的 EST 数据库发现 97.5%都是由 13 个 GFP 基因中的 2 个贡献的结果基本一致。可见并非所有的 GFP 基因都对文昌鱼的荧光信号起决定作用, 一般只有 2~4 个 GFP 基因起主要的作用。

我们还对文昌鱼从卵发育到成体的不同阶段的荧光表达情况进行了系统的观察记录, 结果大体上与已有文献的观察结果相似, 文昌鱼绿色荧光最先强烈表达都集中在幼体的前端和鳃裂中呈现不规则分布, 随后荧光逐渐的集中到成体前端的口笠和触须组织中(Baumann et al, 2008; Bomati et al, 2009; Deheyn et al, 2006; Li et al, 2009; Yu et al, 2004)。不同的是我们在白氏文昌鱼胚胎发育过程中并没有发现文献提到的在受精卵发育到神经胚初期发现的绿色荧光, 我们认为造成这种差异一方面可能是物种间的差别；另一方面是我们观察绿色荧光时曝光时间较短, 实际上许多物质受激发后都有基础荧光发出, 过长的曝光时间显示出来微弱的均匀分布的荧光更大的可能是基础荧光。此外, 我们还首次在由 5 鳃裂幼体期发育至刚变态亚成体的过程中发现位于回接环前端有强烈表达的绿色荧光, 这种荧光最早出现在 5 鳃裂时期的幼鱼, 当 8 鳃裂形成之后普遍可见, 之后伴随着幼体的发育过程逐渐增强, 直到文昌鱼完成变态形成亚成体后才逐渐减弱, 在 86 d 的幼体中进行荧光观察时便已完全消失。这种特异表达强烈荧光在所有文昌鱼的回节环前, 而回节环是文昌鱼肝盲囊和肠道的交接位置, 这种强烈表达绿色荧光的现象可持续长达 40 多天，可能暗示着个别 GFP 可能在文昌鱼的变态过程和成体器官形成中起着一定的作用。

目前对文昌鱼 GFP 基因的功能缺乏足够的认识, 大多与光学相关的功能例如光感受和光保护的作用等, 这些结果都是基于水蚤等物种中 GFP 的研究成果。我们对文昌鱼 GFP 基因的表达谱分析以及对不同时期荧光情况的观察和统计, 可以清楚看到文昌鱼不同发育时期的荧光表达情况, 而且所有 GFP 基因在文昌鱼不同的发育时期都有表达, 但并非所有 GFP 基因都对荧光的产生起着决定性作用。以往 Baumann et al (2008)和 Bomati et al (2009)等在对 5 个佛罗里达文昌鱼 GFP 蛋白的光谱学分析结果也显示只有少数 GFP 表达较强的荧光, 而绝大多数 GFP 的荧光表达较弱甚至没有表达, 这些微弱表达的 GFP 或具有较高的消光系数, 或具有很强的抗氧化性, 暗示在文昌鱼体内至少有 4 种不同功能类型的 GFP 存在, 由此我们推断并不是所有的 GFP 基因都对荧光现象的出现起决定性的作用, 在不同的发育时期各种 GFP 基因可能是在行驶各自不同的功能。对于后口动物中第一个发现 GFP 基因的类群——文昌鱼体内内源性 GFP 功能的进一步的研究,可以结合以上所得到的 qPCR 的结果, 利用 RNAi 和显微注射基因敲除等一系列方法来研究这些 GFP 基因的生理功能, 也可以从蛋白水平对这些 GFP 蛋白的光谱学性质进行深入的研究, 同时结合细胞学上的方法对这些基因的表达荧光强度以及荧光半衰期的淬灭等性质进行系统分析, 从而为进一步了解 GFP 基因在文昌鱼体内的功能奠定坚实的基础。本研究对文昌鱼 GFP 表达情况的分析都是以经过一年多实验室养殖文昌鱼及其后代为材料, 因此，它可能不完全代表在自然界中文昌鱼荧光表达的全部情况。此外，我们通过对文昌鱼的长时间观察,发现文昌鱼生活的环境, 例如盐度、光照、渗透压和温度等一系列影响文昌鱼生殖发育的生态因子对于文昌鱼体内绿色荧光蛋白的表达情况的影响, 也有待进一步分析研究。

参考文献：

Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. 1990. Basic local alignment search tool[J]. *J Mol Biol,* **215**(3): 403-410.

Baumann D, Cook M, Ma L, Mushegian A, Sanders E, Schwartz J, Yu CR. 2008. A family of GFP-like proteins with different spectral properties in lancelet *Branchiostoma floridae* [J]. *Biol Direct,* **3**(1): 28.

Bomati EK, Manning G, Deheyn DD. 2009. Amphioxus encodes the largest

known family of green fluorescent proteins, which have diversified into distinct functional classes [J]. *BMC Evol Biol,* **9**(1): 77.

Chalfie M, Tu, Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC. 1994. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. *Science,* **263**(5148): 802-805.

Deheyn DD, Kubokawa K, McCarthy JK, Murakami A, Porrachia M, Rouse GW, Holland ND. 2007. Endogenous green fluorescent protein (GFP) in amphioxus [J]. *Biol Bull,* **213**(2): 95-100.

Delagrave S, Hawtin RE, Silva CM, Yang MM, Youvan DC. 1995. Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein [J]. *Bio-Technol,* **13**(2): 151-154.

Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. 2001. An overview of real-time quantitative PCR: Applications to quantify cytokine gene expression [J]. *Methods,* **25**(4): 386-401.

Gurskaya NG, Fradkov AF, Pounkova NI, Staroverov DB, Bulina ME, Yanushevich YG, Labas YA, Lukyanov S, Lukyanov KA. 2003. A colourless green fluorescent protein homologue from the non-fluorescent hydromedusa *Aequorea coerulescens* and its fluorescent mutants [J]. *Biochem J,* **373**: 403-408.

Holland LZ, Laudet V, Schubert M. 2004. The chordate amphioxus: an emerging model organism for developmental biology [J]. *Cell Mol Life Sci,* **61**(18): 2290-2308.

Labas YA, Gurskaya NG, Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Lukyanov SA, Matz MV. 2002. Diversity and evolution of the green fluorescent protein family [J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **99**(9942): 4256-4261.

Li G, Zhang QJ, Zhong J, Wang YQ. 2009. Evolutionary and functional diversity of green fluorescent proteins in cephalochordates [J]. *Gene,* **466**(1): 41-49.

Matz MV, Fradkov AF, Labas, YA, Savitsky AP, Zaraisky AG, Markelov ML, Lukyanov SA. 1999. Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species [J]. *Nat Biotechnol,* **17**(10): 969-973.

Morise H, Shimomura O, Johnson FH, Winant J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea [J]. *J Biochemistry,* **13**(12): 2656-2662.

Ong WJH, Alvarez S, Leroux IE , Shahid RS , Samma AA, Peshkepija P, Morgan AL, Mulcahy S, Zimmer M. 2011. Function and structure of GFP-like proteins in the protein data bank [J]. *Mol BioSyst,* **7**(4): 984-992.

Ormö M, Cubitt AB, Kallio K, Gross LA, Tsien RY, Remington SJ. 1996. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein [J]. *Science,* **273**(5280): 1392-1395.

Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees [J]. *Mol Biol Evol,* **4**(4): 406-425.

Shagin DA, Barsova EV, Yanushevich YG, Fradkov AF, Lukyanov KA, Labas YA, Semenova TN, Ugalde JA, Meyers A, Nunez JM, Widder EA, Lukyanov SA, Matz MV. 2004. GFP-like proteins as ubiquitous metazoan superfamily: evolution of functional features and structural complexity [J]. *Mol Biol Evol,* **21**(5): 841-850.

Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. 1962. Extraction, purification and properties of Aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea* [J]. *J Cell Comp Physiol,* **59**(3): 223-239.

Theodosiou M, Colin A, Schulz J, Laudet V, Peyrieras N, Nicolas JF, Schubert M, Hirsinger E. 2011. Amphioxus spawning behavior in an artificial seawater facility [J]. *J Exp Biol,* **346B**(4): 263-275.

Tsien RY. 1998. The green fluorescent protein [J]. *Annu Rev Biochem,* **67**(1): 509-544.

Wall MA, Socolich M, Ranganathan R. 2000. The structural basis for red fluorescence in the tetrameric GFP homolog DsRed [J]. *Nat Struct Biol,* **7**(12): 1133-1138.

Wang YQ, Zhang QJ, Lu XM, Zhong J, Sun Y. 2006. Laboratory culturing and acquirement of the second filial generation of amphioxus [J]. *Zool Res*, **27** (6): 631-634.[王义权, 张秋金, 吕小梅, 钟婧, 孙毅. 2006. 文昌鱼的实验室繁育及子二代获得[J]. 动物学研究, **27** (6): 631-634.]

Yang F, Moss GL, Phillips GN Jr. 1996. The molecular structure of green fluorescent protein [J]. *Nat Biotechnol,* **14**(10): 1246-1251.

Yu JK, Holland ND, Holland LZ. 2004. Tissue-specific expression of *FoxD* reporter constructs in amphioxus embryos [J]. *Dev Biol,* **274**(2): 452-461.

Zhang QJ, Zhang QJ, Zhong J, Fang SH, Wang YQ. 2006. Branchiostoma japonicum and B. belcheri are distinct lancelets (*Cephalochordata*) in Xiamen waters in China [J]. *Zool Sci,* **23**(6): 573-579.

Zimmer M. 2002. Green fluorescent protein (GFP): applications, structure and related photophysical behavior [J]. *Chem Rev,* **102**(3): 759-781.

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 314−318 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03314

闽江水系绒螯蟹的表型性状差异与分子遗传差异的比较与分析

周 陆, 王成辉*, 成起萱, 王中清

(上海海洋大学 农业部淡水水产种质资源重点实验室, 上海 201306)

摘要：表型性状差异(differentiation in phenotypic traits, P_{ST})和分子遗传差异(differentiation at neutral molecular markers, F_{ST})是近期进化生物学的研究热点之一。闽江水系是我国中华绒螯蟹与合浦绒螯蟹的主要混杂地域, 是研究绒螯蟹遗传与进化的理想地之一。为探讨闽江水系绒螯蟹的 P_{ST} 和 F_{ST}, 以 2009 和 2010 年度闽江水系的 133 个绒螯蟹样本为材料, 进行了 14 个表型数量性状差异分析和 6 个微卫星标记的遗传差异分析。结果发现：除 3 个表型性状不存在显著差异外, 其他表型性状在不同年份间均存在极显著差异(P<0.01); 2009 年绒螯蟹的平均期望杂合度极显著高于 2010 年绒螯蟹(P=0.008), 而平均等位基因丰富度、观测杂合度和近交系数均不存在显著差异(P=0.136～0.675); 年份间的平均 F_{ST} 为 0.1429; 通过对 P_{ST} 与 F_{ST} 的比较发现, 除第二步足掌节长度(F2)性状外, 其他表型数量性状的 P_{ST} 值均高于 F_{ST} 值, 表明这些性状均受到了较明显的选择压力。该文研究结果为绒螯蟹的分子进化研究积累了资料, 也为其他水产生物的 P_{ST} 和 F_{ST} 比较研究提供了参考。

关键词：绒螯蟹; 表型数量性状; 微卫星标记; 分子遗传变异
中图分类号：Q959.223; Q347; Q31; Q16 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0314-05

Comparison and analysis between P_{ST} and F_{ST} of mitten crabs in the Minjiang River

ZHOU Lu, WANG Cheng-Hui*, CHENG Qi-Xuan, WANG Zhong-Qing

(*Key Laboratory of Freshwater Aquatic Genetic Resources*, *Ministry of Agriculture*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*)

Abstract: Recently, differentiation in phenotypic traits (P_{ST}) and differentiation at neutral molecular markers (F_{ST}) across populations have been become an important topic in evolutionary biology. The Minjiang River is a key genetic introgression zone between the Chinese mitten crab (*Eriocheir sinensis*) and the Hepu mitten crab (*Eriocheir hepuensis*), making it an excellent area to study their genetics and evolutionary mechanisms. We compared and analyzed P_{ST} in 14 phenotypic traits and F_{ST} in six microsatellite markers from 133 individuals of the mitten crab, sampled in the Minjiang River in 2009 and 2010. The results indicated that 11 phenotypic traits were significantly different (P<0.01) between the 2009 and 2010 populations. The mean expected heterozygosity (H_E) of the 2009 populations was significantly higher (P=0.008) than that of 2010 populations, but the mean allele richness (A_R), observed heterozygosity (H_O) and inbreeding coefficient (F_{IS}) were all not significant between 2009 and 2010 populations (P=0.136−0.675). F_{ST} in microsatellite markers was 0.1429 between the two years. In the 14 traits, only one trait (F2) was found with $P_{ST}<F_{ST}$, suggesting that stabilizing selection is favoring a trait of F2; the other 13 traits were $P_{ST}>F_{ST}$, suggesting that directional selection is occurring. This study provides valuable data to the further study and analysis of the molecular evolution of the mitten crab, and contributes a useful reference in comparing P_{ST} and F_{ST} in other aquatic organisms.

Key words: Mitten crab; Phenotypic quantitative traits; Microsatellite marker; Molecular genetic variation

分子遗传差异(differentiation at neutral molecular markers, F_{ST})是传统的衡量种群遗传分化、种群遗传结构的基本指标(Weir & Cockerham,1984; Wright, 1965), 在遗传学领域有着广泛的应用。数量性状差

收稿日期：2011-12-05；接受日期：2012-04-17
基金项目：上海市科委重点科技攻关项目(09391911100); 上海市中华绒螯蟹产业技术体系建设项目(D8003-10-0208)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: wangch@shou.edu.cn

异(differentiation in quantitative traits, Q_{ST})是指在遗传漂变、选择、基因流和环境适应性等因素作用下, 群体间数量性状的差异(Lande, 1992; Spitze, 1993; Wright, 1951)。它是度量不同群体间数量性状差异程度的一个指标(Spitze, 1993)。当 Q_{ST} 显著大于 F_{ST} 时, 表明群体受到了明显的选择压力; 当 Q_{ST} 显著小于 F_{ST} 时, 表明群体处于稳定的平衡选择之中(O'Hara & Merilä, 2005; Spitze, 1993; Whitlock, 2008)。基于上述假设, Q_{ST} 与 F_{ST} 的比较研究已成为近年来生物进化领域的研究热点之一(Edelaa & Björklund, 2011; Evanno et al, 2006; Santure & Wang, 2009; Whitlock & Guillaume, 2009)。水产生物自 2007 年报道了第一例 Q_{ST} 与 F_{ST} 的比较研究(McClelland & Naish, 2007)后, 至今未见后续报道。由于 Q_{ST} 的计算需根据群体的遗传方差, 这对野生群体较为困难。目前大量研究均以表型性状差异(differentiation in phenotypic traits, P_{ST})来代替 Q_{ST}(Brommer, 2011; Leinonen et al, 2006; Raeymaekers et al, 2007)。

绒螯蟹是东亚地区的特有蟹类, 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)和日本绒螯蟹(*Eriocheir japonica*)是绒螯蟹属的两个最重要经济种类(Zhao et al, 1988)。此外, 分布于我国南方(如广西合浦、广东珠江等)的绒螯蟹为合浦绒螯蟹(Guo et al, 1997; Ng et al, 1999; Wang et al, 2008)。有关作者利用线粒体部分序列分析发现：闽江是中华绒螯蟹与合浦绒螯蟹的混杂地域(Wang et al, 2008)。在生物学特性上, 绒螯蟹的生命周期为两年, 一生只繁殖一次, 繁殖后亲本即死亡, 奇年与偶年生绒螯蟹通常不发生遗传交配或基因交流(如 2009 年出生的绒螯蟹于 2011 年繁育, 2010 年出生的绒螯蟹于 2012 年繁育。2009 与 2010 年和 2011 与 2012 年绒螯蟹不存在遗传基因交流), 因而, 闽江水系绒螯蟹为研究绒螯蟹的表型性状差异与分子遗传差异提供了良好的模型和材料。本文通过对 2009 年(奇年)与 2010 年(偶年)连续两年闽江水系绒螯蟹样本的表型性状差异和微卫星分子遗传差异分析, 在国内外首次探讨水产生物的表型性状差异(P_{ST})与分子遗传差异(F_{ST})的关系, 以期为绒螯蟹的分子进化研究积累资料, 也为其它水产生物的类似研究提供参考或借鉴。

1　材料和方法

1.1　材料

本文以 2009 和 2010 年 10 月上旬采集的闽江水系二龄绒螯蟹天然群体为材料。采样地点为闽江福州江段, 2009 年样本 40 只, 2010 年样本 93 只。

1.2　形态数据测量

首先对采集的每只绒螯蟹样本进行表型性状参数测定(图 1), 包括：体重(BW)、内额齿间距(A1)、外额齿间距(A2)、第一侧齿间距(A3)、第二侧齿间距(A4)、第三侧齿间距(A5)、第四侧齿间距(A6)、背甲后缘长度(A7)、背甲长(L)、体高(H)、第二步足长节长 (F1)、第二步足掌节长(F2)、第二步足指节长(F3)、第二步足指节近掌节端宽度(F4)。体重精确到 0.1 g, 其他性状精确到 0.1 mm。测量后样本取步足肌肉于 95%的酒精中保存, 用于 DNA 提取。

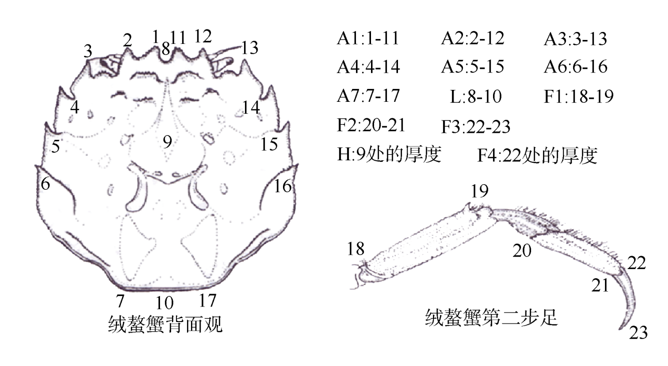


图 1　绒螯蟹表型性状测量示意图
Fig. 1　Measurement landmark for phenotypic traits of mitten crab

1.3　DNA 提取

总 DNA 提取采用饱和氯化钠法：取绒螯蟹肌肉约 0.1 g, 用镊子小心放入 1.5 mL 离心管中, 37 ℃烘箱中烘干酒精, 加入 STE 裂解缓冲液(30 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, pH 8.0) 420 μL, 10%SDS80 μL, 蛋白酶 K(20 mg/mL) 20 μL, 混匀后放入 56 ℃恒温箱中消化过夜; 待消化完毕, 加饱和 NaCl 溶液 340 μL, 轻摇 5 min, 然后加入氯仿 340 μL, 轻轻混匀。室温条件下, 13 000 r/min 离心 20 min, 取上清液转入另一干净的离心管中, 加预冷(–20 ℃)的异丙醇 400 μL 混匀, 4 ℃, 12 000 r/min 离心 20 min, 小心倒尽上清液, 加入预冷 (–20 ℃)的 75%乙醇 800 μL 洗涤 DNA, 混匀, 4 ℃下 12 000 r/min 离心 20 min, 倒掉乙醇, 烘干。加入 TE100 μL 溶解 DNA, 然后保存备用。

1.4　微卫星标记的 PCR 扩增与检测

应用已报道的六对绒螯蟹微卫星引物(Cheng et al , 2009)对样本进行 PCR 扩增。PCR 反应总体积为 10 μL, 包括 1 μL 基因组 DNA(20 ng/μL)、5 μL 缓冲液(0.2 μmol/L dNTPs, 1.5 μmol/L $MgCl_2$, 0.5

μmol/L Taq DNA 聚合酶)、1 μL 引物、3 μL 蒸馏水。PCR 扩增程序：94 ℃预变性 5 min, 随后进行 35 个循环, 每循环为 94 ℃变性 30 s、 48～61 ℃退火 30 s、72 ℃延伸 30 s, 最后 72 ℃延伸 10 min。

PCR 产物利用德国 Qiagen 公司生产的遗传分析系统(QIAxcel)进行检测和片段分析。

1.5 数据处理

1.5.1 表型性状差异(P_{ST})计算 首先将表型性状参数分别除以背甲长(L), 转换为比例性状参数, 以消除规格大小对数据分析的影响, 体重性状进行自然对数转换。然后, 对转换后的数据进行正态性检验和均质性检验。应用 Statistica 8.0 软件对校正后的数据进行单因素方差分析(ANOVA), 以及计算各表型性状的群体内方差(σ^2_{GW})和群体间方差(σ^2_{GB}), 根据 Raeymaekers et al(2007)的公式计算表型性状差异 (P_{ST}), 公式具体如下：

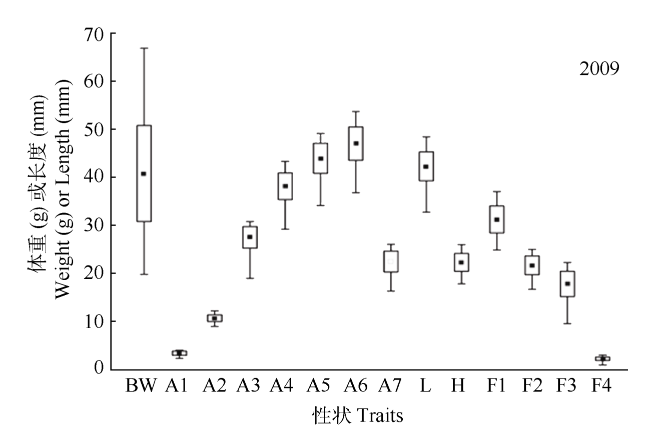
$$P_{ST}=\sigma^2_{GB}/(\sigma^2_{GB}+2\sigma^2_{GW})$$

1.5.2 分子遗传差异(F_{ST})计算 根据微卫星标记的等位基因频率, 利用 FSTAT2.9.4 软件(Goudet et al, 1995)计算群体观测杂合度(H_O)和期望杂合度(H_E)、等位基因丰富度(A_R)和近交系数(F_{IS}), 并进行哈迪−温伯格平衡检验(HWE)。应用 Arlequin 软件(Excoffier & Lischer, 2010)计算群体间的分子遗传差异(F_{ST})。

2 结 果

2.1 表型性状差异

对 2009 和 2010 年绒螯蟹样本的表型性状数据作正态性检验和均质性检验发现, 所有表型性状参数均满足正态性分布(P=0.073～0.824)。2009 年绒螯蟹的体重变异程度大于 2010 年绒螯蟹, 而形态性状(F4 除外)的变异程度略低于 2010 年绒螯蟹, 具体如图 2 所示。单因素方差分析(ANOVA)表明：除 A1(P=0.149)、F1(P=0.096)和 F2(P=0.897)三个性状差异不显著外, 其他各表型性状在不同年份间均存在极显著差异(P<0.149)(表 1)。



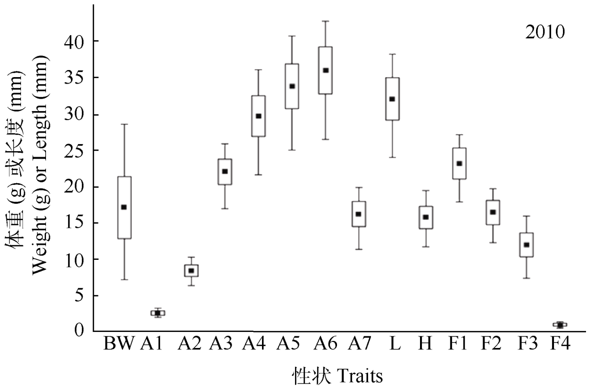


图 2 2009 与 2010 年绒螯蟹的表型性状变异

Fig. 2 Phenotypic trait variation in the 2009 and 2010 populations of the mitten crab

实心黑框为性状平均值；空心黑框为性状标准差；实线两端为性状的最大值与最小值。

Mean values are presented by black dots, standard variation are presented by black block, maximum and minimum values are presented by black lines.

表 1 2009 与 2010 年绒螯蟹表型性状的单因素方差分析

Tab. 1 One-way variance analysis (ANOVA) for the 2009 and 2010 populations of the mitten crab

性状 Traits	BW	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	H	F1	F2	F3	F4
F 值 *F*-value	307.07	2.10	31.00	57.17	34.13	21.46	10.51	18.20	43.73	2.82	0.02	30.26	280.41
P 值 *P*-value	0.001	0.149	0.001	0.001	0.001	0.001	0.002	0.001	0.001	0.096	0.897	0.001	0.001

2.2 微卫星遗传变异

2009 和 2010 年度闽江水系绒螯蟹的微卫星遗传变异情况如表 2 所示。2009 年绒螯蟹的平均等位基因数低于 2010 年绒螯蟹, 而其观测杂合度、期望杂合度和近交系数均高于 2010 年。哈迪−温伯格平衡检验表明, 除 2010 年群体中 HPX-69 位点符合哈迪−温伯格平衡外, 2009 年 6 个位点和 2010 年 5 个位点均偏离哈迪−温伯格平衡。经检验, 年度间的期望杂合度存在极显著差异(P=0.008), 而其他 3 个遗传变异指标均不存在显著差异(P=0.136～

表 2　2009 与 2010 年绒螯蟹的微卫星分子遗传变异参数

Tab. 2　Genetic variation parameters for the 2009 and 2010 populations of the mitten crab based on microsatellite data

位点 Locus	2009						2010						F_{ST}
	n	A_R	H_O	H_E	F_{IS}	P_{HWE}	n	A_R	H_O	H_E	F_{IS}	P_{HWE}	
HPX-2	40	11.00	0.5750	0.8889	0.356	0.0000	93	12.36	0.3441	0.8696	0.606	0.0000	0.0361
HPX-6	40	14.33	0.9250	0.8392	-0.104	0.0046	93	13.44	0.8280	0.8929	0.073	0.0000	0.0180
HPX-9	40	9.53	0.4750	0.8851	0.467	0.0000	93	16.50	0.1398	0.2778	0.498	0.0000	0.4695
HPX-22	40	12.94	0.8000	0.9089	0.121	0.0002	93	13.33	0.8280	0.8990	0.079	0.0000	0.0165
HPX-54	40	5.90	0.5000	0.7133	0.302	0.0000	93	9.00	0.0538	0.3149	0.830	0.0000	0.3705
HPX-69	40	11.62	0.7250	0.9142	0.209	0.0067	93	13.48	0.8495	0.8838	0.039	0.1974	0.0280
平均值 mean		10.89	0.6667	0.8583	0.2252	0.0019		13.02	0.5072	0.6896	0.3542	0.0329	0.1429

n：样本数; A_R：等位基因丰富度; H_O：观测杂合度;　H_E：期望杂合度; F_{IS}：近交系数; F_{ST}：分子遗传差异; P-value：哈迪–温伯格平衡检验 P 值。
n: specimen size; A_R: allelic richness; H_O: observed heterozygosity; H_E: expected heterozygosity; F_{IS}: inbreeding coefficient; F_{ST}: genetic differentiation at microsatellite markers; P_{HWE}：P-value for Hardy-Weinberg equilibrium test.

0.675)。两群体间的分子遗传差异(F_{ST})为 0.0165～0.4695, 平均为 0.1429。AMOVA 分析(表 3)也表明, 两群体间的遗传变异，占总变异的 14.29%, 群体内个体间的遗传差异为 21.54%。

表 3　绒螯蟹分子遗传变异的分子方差分析

Tab. 3　Analysis of molecular variance (AMOVA) between the 2009 and 2010 populations of the mitten crab

变异来源 Source of variation	自由度 df	占总变异的百分比(%) Percentage of variation	遗传差异指数 Fixation indices	P 值 P value
群体间 Between populations	1	14.29	F_{ST}=0.1429	<0.001
群体内个体间 Among individuals within populations	131	21.54	F_{IS}=0.2514	<0.001
个体内 Within individuals	133	64.17	F_{IT}=0.3583	<0.001

2.3　P_{ST} 与 F_{ST} 比较

计算得出各性状的 P_{ST} 值(BW:0.9788; A1:0.5105; A2:0.9266; A3:0.9525; A4:0.9317; A5:0.9028; A6:0.8306; A7:0.8895; H:0.9429; F1:0.5815; F2:0.0084; F3:0.9253; F4:0.9783)后, 通过与 F_{ST} 的比较作图(图 3)可以看出, 除第二步足掌节长度(F2)这一性状外, 其他性状的 P_{ST} 值均高于 F_{ST} 平均值。

3　讨　论

生物表型性状的数值比较宏观，相对容易获得，因此, 通过研究生物的表型性状来发现生物个体以及群体间的差异是比较常用的方法(Leeann, 2008; Myers et al, 2001; Traka-Mavrona, 1996)。本研究发现, 在奇年(2009)与偶年(2010)闽江水系绒螯

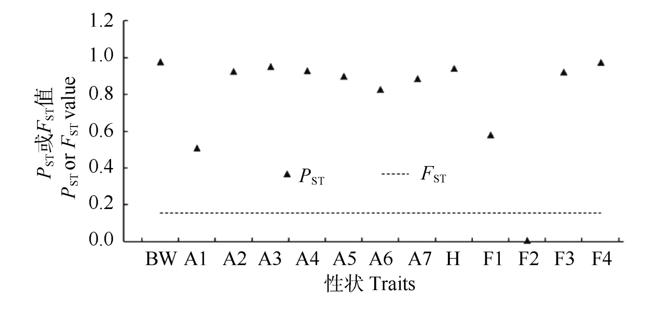


图 3　闽江水系绒螯蟹的 P_{ST} 与 F_{ST} 比较

Fig. 3　Diplot of P_{ST} and F_{ST} for mitten crab distributed in Minjiang River

蟹的 13 个所测表型性状中, 除三个性状(A1、F1 和 F2)不存在显著差异外, 其他各性状均存在极显著差异，因为河蟹是一种生命周期为两年、一生只繁殖一次的生物(即 2009 年样本与 2010 年样本不存在交叉繁殖和基因交流), 不同遗传背景和年份间生活环境会对表型性状造成较大影响, 应用不同年份间的绒螯蟹样本探讨表型性状差异是可行的。微卫星标记常用于水产动物的研究中(Ma et al, 2005; Zhang et al, 2010)。本研究通过微卫星标记分析发现, 2009 与 2010 年样本间，只在期望杂合度存在显著差异, 而在等位基因丰富度、观察杂合度和近交系数这三个遗传参数均不存在显著差异, 表明年份间样本的分子遗传变异与表型变异存在变异的非一致性, 这为研究 P_{ST} 与 F_{ST} 提供了有利条件。以上也说明, 闽江水系绒螯蟹可较好地应用于绒螯蟹的 P_{ST} 与 F_{ST} 研究。

P_{ST} 是度量不同群体间表型性状分化的程度, F_{ST} 是度量不同群体间分子标记的遗传差异程度

(Volis et al, 2005; Yang et al, 2008)。通过对 P_{ST} 和 F_{ST} 的比较, 可了解不同进化机制对群体间差异的影响程度和作用大小。在迁移、突变或遗传漂变的作用下, 群体间的表型性状差异近似于中性分子遗传差异, 但多样性的选择会导致群体间的表型性状差异显著大于分子遗传差异(Lande, 1992; McKay & Latta, 2002; Merilä & Crnokrak, 2001)。本研究通过对各性状的 P_{ST} 值计算, 并与 F_{ST} 值进行比较, 结果表明: 除第二步足掌节长度(F2)外, 其他各性状 P_{ST} 值都远大于 F_{ST} 值, 这说明闽江绒螯蟹群体除F2外, 其它性状均受到外界的选择压力, 受到自然选择的作用, 以及群体的地方适应性。

参考文献:

Brommer JE. 2011. Whither P_{ST}? The approximation of Q_{ST} by P_{ST} in evolutionary and conservation biology [J]. *J Evol Biol,* **24**(6): 1160-1168.

Cheng QX, Wang CH, Xu JW, Wang J, Yang QL. 2009. Novel microsatellite markers for endangered Hepu mitten crab, *Eriocheir hepuensis* [J]. *Conserv Genet Resour,* **1**(1): 357-360.

Edelaa P, Björklund M. 2011. If F_{ST} does not measure neutral genetic differentiation, then comparing it with Q_{ST} is misleading. Or is it? [J]. *Mol Ecol,* **20**(9): 1805-1812.

Evanno G, Castella E, Goudet J. 2006. Evolutionary aspects of population structure for molecular and quantitative traits in the freshwater snail *Radix balthica* [J]. *J Evol Biol,* **19**(4): 1071-1082.

Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3. 5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows [J]. *Mol Ecol Resour,* **10**(3): 564-567.

Goudet J. 1995. FSTAT (version 1. 2): A computer program to calculate F-statistics [J]. *Heredity,* **86**(6): 485-486.

Guo JY, Ng NK, Dai A, Ng PKL. 1997. The taxonomy of three commercially important species of mitten crabs of the genus *Eriocheir* de Hann, 1835 (Crustacea: Decapod: Brachyura: Grapsidae) [J]. *Raffles Bull Zool,* **45**(2): 445-476.

Lande R. 1992. Neutral theory of quantitative genetic variance in an island model with local extinction and colonization [J]. *Evolution,* **46**(2): 381-389.

Leeann TR. 2008. Female preference for male phenotypic traits in a fiddler crab: do females use absolute or comparative evaluation? [J]. *Anim Behav,* **77**(1): 139-143.

Leinonen T, Cano JM, Mäkinen H, Merilä J. 2006. Contrasting patterns of body shape and neutral genetic divergence in marine and lake populations of threespine sticklebacks [J]. *Evol Biol,* **19**(6): 1803-1812.

Ma HT, Chang YM, Yu DM, Sun XW. 2007. Microsatellite variations among four populations of *Eriocheir sinensis* [J]. *Zool Res*, **28** (2): 126-133. [马海涛, 常玉梅, 于冬梅, 孙效文. 2007. 利用微卫星分子标记分析四个中华绒螯蟹群体的遗传多样性. 动物学研究, **28** (2): 126-133.]

McClelland EK, Naish KA. 2007. Comparisons of F_{ST} and Q_{ST} of growth-related traits in two populations of Coho Salmon [J]. *Trans Am Fish Soc,* **136**(5): 1276-1284.

Merilä J, Crnokrak P. 2001. Comparison of genetic differentiation at marker loci and quantitative traits [J]. *J Evol Biol,* **14**(6): 892-903.

McKay JK, Latta RG. 2002. Adaptive population divergence: markers, QTL and traits [J]. *Trend Ecol Evol,* **17**(6): 285-291.

Myers JM, Hershberger WK, Saxton AM, Iwamoto RN. 2001. Estimates of genetic and phenotypic parameters for length and weight of marine net-pen reared coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum)[J]. *Aquac Res,* **32**(4): 277-285.

Ng NK, Guo JY, Ng PKL. 1999. Generic affinities of *Eriocheir leptognathus* and *E. formosa* with description of a new genus (Brachyura: Grapsidae: Varuninae) [J]. *J Crustacean Biol,* **19**(1): 154-170.

O'Hara RB, Merilä J. 2005. Bias and precision in Q_{ST} estimates: problems and some solutions [J]. *Genetics,* **171**(3): 1331-1339.

Raeymaekers JAM, Van Houdt JKJ, Larmuseau MHD, Geldof S, Volckaert FAM. 2007. Divergent selection as revealed by P_{ST} and QTL-based F_{ST} in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus*) populations along a coastal-inland gradient [J]. *Mol Ecol,* **16**(4): 891-905.

Santure AW, Wang JL. 2009. The joint effects of selection and dominance on the Q_{ST}-F_{ST} contrast [J]. *Genetics,* **181**(1): 259-276.

Spitze K. 1993. Population structure in *Daphnia obtusa*: quantitative genetic and allozymic variation [J]. *Genetics,* **135**(2): 367-374.

Traka-Mavrona E. 1996. Effects of competition on phenotypic expression and differentiation of five quality traits of carrot (*Daucus carota* L.) and their implications in breeding [J]. *Sci Hortic：Amsterdam,* **65**(4): 335-340.

Volis S, Yakubov B, Shulgina I, Ward D, Mendlinger S. 2005. Distinguishing adaptive from nonadaptive genetic differentiation: comparison of Q_{ST} and F_{ST} at two spatial scales [J]. *Heredity,* **95**(6): 466-475.

Wang CH, Li CH, Li SF. 2008. Mitochondrial DNA-inferred population structure and demographic history of the mitten crab (*Eriocheir sensu stricto*) found along the coast of mainland China [J]. *Mol Ecol,* **17**(15): 3515-3527.

Weir BS, Cockerham CC. 1984. Estimating F-statistic for the analysis of population-structure[J]. *Evolution,* **38**(6): 1358-1370.

Whitlock MC, Guillaume F. 2009. Testing for spatially divergent selection: comparing Q_{ST} to F_{ST}[J]. *Genetics,* **183**(3): 1055-1063.

Whitlock ME. 2008. Evolutionary inference from Q_{ST} [J]. *Mol Ecol,* **17**(8): 1885-1896.

Wright S. 1951. The genetical structure of populations [J]. *Ann Eugen,* **15**(1): 323-354.

Wright S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating [J]. *Evolution,* **19**(3): 395-420.

Yang W, Ye QG, Li ZZ, Huang HW. 2008. Genetic differentiation of quantitative traits and local adaptability of remnant populations of *Isoetes sinensis* and implications for conservation and genetic reinforcement[J]. *J Plant Ecol,* **32**(1): 143-151. [杨伟, 叶其刚, 李作洲, 黄宏文. 2008. 中华水韭残存居群的数量性状分化和地方适应性及其对保育遗传复壮策略的提示. 植物生态学报, **32**(1): 143-151.]

Zhang Y, Lu CY, Cao DC, Xu P, Wang S, Li HD,Zhao ZX, Sun XW.2010. Rates and patterns of microsatellite mutations in common carp (Cyprinus carpio L.) [J]. *Zool Res*, **31**(5):561−564. [张研, 鲁翠云, 曹顶臣, 徐鹏, 王书, 李恒德, 赵紫霞, 孙效文. 2010. 鲤鱼微卫星突变速率和模式. 动物学研究, **31**(5):561−564.]

Zhao NG, Du NS, Bao XS. 1988. The artificial propagation and aquaculture of *Eriocheir sinensis* [M]. Hefei: Anhui Science & Technology Publishing House, 75-77. [赵乃刚, 堵南山, 包祥生. 1988. 中华绒螯蟹的人工繁殖与增养殖. 合肥: 安徽科学技术出版社, 75-77.]

动　物　学　研　究　2012，Jun. 33(3): 319−328　　CN 53-1040/Q　ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03319

基于线粒体 *COI* 基因全序列的直翅目部分类群系统发育关系分析

吕红娟, 黄　原*

(陕西师范大学 生命科学学院, 西安　710062)

摘要：该研究基于直翅目 56 种昆虫的 *COI* 基因全序列构建了该目部分类群间的系统发育关系, 同时也分析了 *COI* 基因编码的氨基酸序列构建直翅目系统发育关系的可靠性。将 *COI* 序列按照密码子一、二、三位点划分, 分别计算 PBS(partioned Bremer support)值, 评估蛋白质编码基因密码子不同位点的系统发生信号强度。分析结果支持螽亚目和蝗亚目的单系性; 剑角蝗科、斑腿蝗科、斑翅蝗科、网翅蝗科和槌角蝗科 5 科均不是单系群, 科间的遗传距离在 0.107~0.153 之间变化, 与其他科相比遗传距离较小, 符合将这 5 科合并为一科(即蝗科)的分类系统, 瘤锥蝗科和锥头蝗科归为锥头蝗总科, 癞蝗科单独成为一科, 这也与 Otte (1997)系统的划分一致。根据 PBS 值的大小推断密码子第三、第一位点对系统树分支的贡献比第二位点大, 并且较长的序列含有较多的信息位点。研究也证实将各物种 *COI* 基因之间的遗传距离作为直翅目划分科级阶元的工具是可行的。

关键词：直翅目; *COI* 基因; 系统发育
中图分类号：Q969.26; Q96; Q754　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)03-0319-10

Phylogenetic relationship among some groups of orthopteran based on complete sequences of the mitochondrial *COI* gene

LÜ Hong-Juan, HUANG Yuan*

(*College of Life Sciences*, *Shaanxi Normal University*, *Xi'an*　710062, *China*)

Abstract: Complete sequences of the *COI* gene were used to reconstruct the phylogenetic relationship among 56 species from Orthoptera. We also analyzed the reliability of Orthoptera phylogenetic relationship using translated amino acid sequences of the *COI* genes. The *COI* sequences were divided into three data sets on the basis of different codon positions to calculate the Partitioned Bremer support (PBS), and to test the phylogenetic signal in different codon positions of protein-coding genes. The result supports the monophyly of Caelifera and Ensifera; but the monophyly of Acrididae, Catantopidae, Oedipodidae, Arcypteridae and Gomphoceridae are not supported. The P-distances among families vary from 0.107 to 0.153, which are smaller than those of other families, being consist with the classification that these 5 families should be merged into one family (Acrididae). Chrotogonidae and Pyrgomorphidae belong to the superfamily Pyrgomorphoidea. Pamphagidae should be a family alone consistent with Otte's taxonomic system. According to the PBS values, the 3rd and 1st codon positions contribution more for the Phylogenetic tree branches than the 2nd, and longer sequences contain more informative sites. We further demonstrated that it is feasible for phylogenetic studies at family level to use the genetic distances among *COI* sequences from different species of Orthopera.

Key words: Orthoptera; *COI* gene; Phylogeny

直翅目是不完全变态类昆虫中最大和研究最多的一个目。一般学者支持直翅目分为螽亚目（Ensifera）和蝗亚目（Caelifera） 2 个亚目。目前我国普遍使用的分类系统中, 将螽亚目分成驼螽总科、裂跗螽总科、沙螽总科、螽蟖总科、鸣螽总科、蟋蟀总科、蝼蛄总科共 7 个总科(Liu & Jin, 1992, 1993; Zheng & Gui, 1999); 将蝗亚目分为蜢总科、蝗总科、蚱总科、蚤蝼总科 4 个总科(Zheng & Gui,

收稿日期：2011-12-19；接受日期：2012-03-20
基金项目：国家自然科学基金(30970346, 31172076); 中央高校基本科研业务费专项资金资助(GK201001004)
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: yuanh@snnu.edu.cn
第一作者简介：吕红娟, 硕士研究生, 研究方向：动物分子生物学, E-mail: lvhongjuan@stu.snnu.edu.cn

1999), 而蝗总科下分为 9 个科, 其中在我国分布的有 8 个科(Xia, 1958; Yin, 1982)。

近年来, 线粒体DNA(mtDNA)已成为动物分类中应用最广泛的分子标记, 例如 *COI*、*CO II*、Cytb、12S rRNA、16S rRNA、*ND2* 等(Liang et al, 2008;Wang & Yang, 2002; Yang & Lin, 2010)。在昆虫系统发育研究中, *COI* (cytochrome oxidase subunit I)基因是应用频率较高的一个分子标记。*COI*基因编码细胞色素氧化酶亚基I, 是细胞色素C氧化酶的重要组成部分, 昆虫中 *COI* 基因长度在 1 500 bp 左右。Pan et al (2006)利用 *COI* 基因的条形码对斑腿蝗科 7 种蝗虫进行了研究; Zhang (2009)基于 28S rRNA 和 *COI* 基因对蝗总科部分种类进行了系统学研究; Wang et al (2011)基于 18S rRNA 对直翅目主要类群的系统发育关系进行了研究; Sun et al (2006)基于 16S rRNA 研究了中国剑角蝗科的单系性; Wang et al (2008)基于Cytb和*COI*基因对蝗科中五个亚科进行了系统发育关系分析; Ding & Huang (2008)基于 *ND2* 基因对中国斑翅蝗科部分种类进行了系统学研究。从以上专家学者的研究表明，对于直翅目的系统发育研究主要集中在蝗亚目，对于螽亚目的研究较少。而 *COI* 基因作为分子标记，主要是利用大约 600 bp 的片段鉴别亚科、科及以下物种的系统发育关系(Huang et al, 2008; Liu et al, 2010; Wang & Huang, 2006), 迄今还没有利用 COI 基因全序列研究直翅目内高级阶元(亚目、总科、科)系统发育关系的研究报道。

本研究基于直翅目 56 种昆虫和 3 个外群种的 *COI* 基因全序列, 旨在探讨直翅目各高级阶元之间的系统发育关系及将各物种 *COI* 基因间的遗传距离作为直翅目划分科级阶元的可行性。而本研究测出的 23 条 *COI* 序列也为直翅目昆虫起源与进化关系的研究提供了有效的数据补充。

1 材料与方法

1.1 实验标本的采集、保存与鉴定

本研究共涉及直翅目蝗亚目 40 个种, 螽亚目 16 个种, 外群 3 个种 (蜚蠊目、等翅目和竹节虫目各 1 种) (表 1), 其中 23 个物种的序列由本实验室测定, 另外 33 种下载自 GenBank, 各序列来源

表 1 样品的种类、来源及 GenBank 登录号
Tab. 1 Sample sources and their GenBank accession numbers

分类地位 Classification	种 Species	采集地点 Sampling locality	GenBank 登录号 GenBank accession no.
蝗亚目 Caelifera 蝗总科 Acridoidea			
斑腿蝗科 Catantopidae	小卵翅蝗 *Caryanda elegans*	云南勐腊县补蚌	JQ301450
	紫胫长夹蝗 *Choroedocus violaceipes*	云南潜洱市	JQ301451
	长翅燕蝗 *Eirnephilus longipennis*	河北省涿鹿县杨家坪	JQ301452
	斑角蔗蝗 *Hieroglyphus annulicornis*	浙江杭州	JQ301453
	斑腿勐腊蝗 *Menglacris maculata*	云南省普洱菜阳河	JQ301454
	霍山蹦蝗 *Sinopodisma houshana*	湖北武汉木兰山	JQ301455
	柯氏无翅蝗 *Zubovskia koeppeni*	黑龙江二道白河	JQ301456
	Schistocerca gregaria gregaria		GQ491031
	中华稻蝗 *Oxya chinensis*		EF437157
	意大利蝗 *Calliptamus italicus*		EU938373
	长翅幽蝗 *Ognevia longipennis*		EU914848
	四川凸额蝗 *Traulia szetschuanensis*		EU914849
斑翅蝗科 Oedipodidae	云斑车蝗 *Gastrimargus marmoratus*		EU513373
	亚洲飞蝗 *Locusta migratoria migratoria*		EU287446
	非洲飞蝗 *Locusta migratoria*		X80245
	东亚飞蝗 *Locusta migratoria manilensis*		GU344101
	亚洲小车蝗 *Oedaleus decorus asiaticus*		EU513374
网翅蝗科 Arcypteridae	青脊竹蝗 *Ceracris nigricornis nigricorns*	湖北神农架	JQ301457
	黑膝异爪蝗 *Euchorthippus fusigeniculatus*	河南卢氏狮子坪	JQ301458
	理塘白纹蝗 *Leuconemacris litangensis*	四川理塘	JQ301459
	隆额网翅蝗 *Arcyptera coreana*		GU324311
	中华雏蝗 *Chorthippus chinensis*		EU029161

续表

分类地位 Classification	种 Species	采集地点 Sampling locality	GenBank 登录号 GenBank accession no.
蝗亚目 Caelifera 蝗总科 Acridoidea			
槌角蝗科 Gomphoceridae	红拟棒角蝗 *Gomphocerippus rufus*		GU294759
	李氏大足蝗 *Gomphocerus licenti*		GQ180102
	西藏大足蝗 *Gomphocerus sibiricus tibetanus*		NC_015478
剑角蝗科 Acrididae	云南卡蝗 *Carsula yunnana*	云南省宁洱	JQ301460
	威廉剑角蝗 *Acrida willemsei*		EU938372
	中华剑角蝗 *Acrida cinerea*		NC_014887
	白纹佛蝗 *Phlaeoba albonema*		EU370925
瘤锥蝗科 Chrotogonidae	乡城湄公蝗 *Mekongiana xiangchengensis*	四川乡城	JQ301461
	西藏澜沧蝗 *Mekongiella xizangensis*	西藏工布江达县城	JQ301462
	云南蝗 *Yunnanites coriacea*	云南昆明	JQ301463
癞蝗科 Pamphagidae	友谊华癞蝗 *Sinotmethis amicus*	甘肃肃州	JQ301464
	笨蝗 *Haplotropis brunneriana*	黑龙江加格达奇	JQ301465
	宽纹蚤蝗 *Thrinchus schrenkii*		NC_014610
锥头蝗科 Pyrgomorphidae	短额负蝗 *Atractomorpha sinensis*		EU263919
大腹蝗科 Pneumoridea	*Physemacris variolosa*		NC_014491
蝗亚目 Caelifera 蜢总科 Eumastacoidea			
枕蜢科 Episactidae	郑氏比蜢 *Pielomastax zhengi*		JF411955
蝗亚目 Caelifera 蚤蝼总科 Tridactyloidea			
蚤蝼科 Tridactylidae	日本蚤蝼 *Tridactylus japonicus*	陕西宁陕	JQ301449
	Ellipes minuta		NC_014488
螽亚目 Ensifera 螽蟖总科 Tettigonioidea			
螽蟖科 Tettigoniidae	中华寰螽 *Atlanticus sinensis*	河北保定	JQ301444
	暗褐蝈螽 *Gampsocleis sedakovii*	河北涿鹿	JQ301466
	摩门螽蟖 *Anabrus simplex*		EF373911
	优雅蝈螽 *Gampsocleis gratiosa*		EU527333
草螽科 Conocephalidae	斑翅草螽 *Conocephalus maculatus*	河北顺平	JQ301445
	疑钩额螽 *Ruspolia dubia*		EF583824
硕螽科 Bradyporidae	笨棘颈螽 *Deracantha onos*		EU137664
露螽科 Phaneropteridae	陈氏掩耳螽 *Elimaea cheni*		GU323362
螽亚目 Ensifera 驼螽总科 Rhaphidophoroidea			
驼螽科 Rhaphidophoridae	*Troglophilus neglectus*		EU938374
螽亚目 Ensifera 蟋蟀总科 Grylloidea			
蟋蟀科 Gryllidae	银川油葫芦 *Teleogryllus infernalis*	河北蔚县	JQ301446
	多伊棺头蟋 *Loxoblemmus doenitzi*	河北保定	JQ301447
	黄脸油葫芦 *Teleogryllus emma*		EU557269
蛣蟋科 Eneopteridae	云斑金蟋 *Xenorryllus marmoratus*	河北保定	JQ301448
蚁蟋科 Myrmecophilidae	*Myrmecophilus manni*		EU938370
螽亚目 Ensifera 蝼蛄总科 Gryllotalpoidea			
蝼蛄科 Gryllotalpidae	东方蝼蛄 *Gryllotalpa orientalis*		AY660929
	Gryllotalpa pluvialis		EU938371
蜚蠊目 Blattaria	德国小蠊 *Blattella germanica*		NC_012901
等翅目 Isoptera	*Reticulitermes hageni*		NC_009501
竹节虫目 Phasmida	海南竹节虫 *Ramulus hainanense*		NC_013185

见表 1。

1.2 基因组总 DNA 的提取

取昆虫后足股节, 用无菌水冲洗后, 放于滤纸上剪开外骨骼取出肌肉放入离心管中, 加入 300 μL 匀浆缓冲液, 剪碎并研磨, 再加入 300 μL 匀浆缓冲液。60 ℃水浴消化 5～6 h。随后用水饱和酚抽提法及氯仿−异戊醇抽提法提取基因组 DNA。再用无水乙醇及 70%乙醇提纯，洗涤后真空干燥, 并溶解于灭菌三蒸水中, –20 ℃长期保存备用。

1.3 *COI* 基因的 PCR 扩增及测序

PCR 扩增 *COI* 基因采用的是通用引物 TY-J-1460 5'-*TACAATTATCGCCTAAACTTCAGCC*-3' 和 C2-N-3661 5'-*CCACAAATTTCAGAACATTGTCCA*-3'(Simon et al, 1994)。PCR 反应体系为：10×ExTaq 缓冲液 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.5 μL, 25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL, 上下游引物 (20 mmol/L)各 0.3 μL, ExTaq DNA 聚合酶 1 U, 5~10 ng /μL, 总 DNA 模板 1.0 μL, 纯水 17.7 μL, 总反应体积 25 μL。PCR 条件是: 95 ℃ 5 min 预变性; 94 ℃ 40 s, 52 ℃ 50 s, 72 ℃ 2 min, 共 40 个循环; 72 ℃延伸 10 min。PCR 产物用 1%的琼脂糖凝胶电泳进行检测。

PCR 产物用 0.8%琼脂糖凝胶电泳切胶回收, 用北京百泰克生物技术有限公司的离心柱型 PCR 产物试剂盒回收胶块。回收 PCR 产物在上海生工生物工程有限公司测序。测序结果使用 Staden Package (Bonfield & Staden 2002)软件包中 Pregap 4 进行拼接。

1.4 数据的处理与计算

采用 Clustal X2.0 (Larkin et al, 2007)对序列进行比对, 为了检验扩增及测序过程中可能产生的突变(包括假基因的判断), 需要将 *COI* 基因序列翻译成氨基酸序列。在 MEGA4.1(Kumar et al, 2008)中导入保存的 fasta 格式的序列, 指定密码子在序列中的起点, 从序列的第一位开始翻译, 将 DNA 序列翻译成氨基酸序列, 结果发现所有的序列全长都能翻译通, 证明没有产生框内终止密码子。将氨基酸序列比对后再转成 DNA 序列, 保存备用。

比对后的序列在 MEGA4.1 中进行序列组成分析, 将序列分为全数据组和根据密码子的不同位点划分的密码子第一、第二和第三位数据组共 4 个数据集, 进行碱基替换饱和分析, 分别计算碱基组成、保守位点、变异位点、转换数与颠换数的比值(R 值)等, 并统计 *COI* 基因的密码子使用情况。

依据已建立的系统树, 按系统树得到的分支情况将蝗总科和螽蟖总科以科为单位划分成组, 用 MEGA 4.1 计算各组间的遗传距离。再按分支情况将蝗亚目和螽亚目以总科为单位划分成组, 计算各组间的遗传距离。

1.5 系统发育分析策略

基于完成比对的 *COI* 序列, 利用 Modeltest3.7 (Posada, 2003)和 MrModeltest2.2 (Nylander, 2004) 选择核苷酸替换模型并计算相关参数; 利用 ProtTest2.4 (Abascal et al, 2009; Reeves, 1992) 选择氨基酸替换模型并计算相关参数; 用 PAUP*4.0 b10 (Swofford, 2002) 、 MrBayes3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck, 2003)、RAxML7.0.4 (Stamatakis, 2006) 和 Treefinder (Abascal et al, 2007)软件重建各物种间的系统发育关系。在整个分析过程中都选用 *Blattella germanica*、*Reticulitermes hageni* 以及 *Ramulus hainanense* 作外群。

在 PAUP*4.0 b10 中, 基于核苷酸序列用最大简约法 (maximum parsimony, MP) 构建未加权 MP 树与加权 MP 树, 均进行 1 000 次重复的自举检验。其中, 加权简约树根据 R 值大小, 采取颠换赋权值 1.0, 转换赋权值 0.8 的方法(Ding & Huang, 2008); 基于 K2P 距离采用邻接法(neighbor joining, NJ)构建 NJ 树; 采用最大似然法(maximum likelihood, ML), 以 Modeltest3.7 中 hLRT 筛选出的最优模型 GTR+I+G 在 PAUP*4.0 b10 中构建 ML 树, 由于 ML 树的运算量较大, 在 RAxML 中对 ML 树进行了 500 次自举检验。贝叶斯法 (Bayesian inference, BI)分析时, 以 MrModelTest 选出的最优模型 GTR+I+G, 在 MrBayes 软件中运行 4 个马尔可夫链, 共运行 150 万代, 每 100 代储存一次树, 重复一次, 在舍去老化样本后(300 代), 对剩余树构建合一树, 得到贝叶斯树。以 ProtTest2.4 筛选的氨基酸最优模型 MtREV+I+G+F 在 Treefinder 中对氨基酸序列构建 ML 树, 进行 1 000 次重复的自举检验。

运用 PAUP*4.0 b10 对各种方法构建的系统树进行了 KH (Kishino-Hasegawa) 检验和 SH (Shimodaira-Hasegawa)检验, 比较各系统树间的差异是否显著。应用 TreeRot.v3 (Sorenson & Franzosa, 2007)和 PAUP*4.0 b10 软件计算 PBS 值, 用以评估基于 COI 基因构建的系统树的每个节点的支持度。

2　结果与分析

2.1　*COI* 序列组成

经序列比对及手工校正, 56 条 *COI* 序列共有 1 566 个位点。其中有保守位点 577 个、变异位点 971 个、简约位点 783 个、自裔位点 188 个（比对中有空位）。A、T、G、C 的平均含量分别为 32.6%、34.5%、15.2%和 17.7%, A+T 含量为 67.1%, 明显高于 G+C 平均含量(32.9%), 说明 COI 的碱基组成具有偏向性。另外, 密码子不同位点的 A, T, G, C 含量也不同, 但都表现出明显的 A+T 含量偏向性, 特别在密码子第三位, A+T 含量高达 84.9%。简约信息位点(Pi)以及变异位点(V)所占比率最小的均是密码子第二位点(分别为 16.3%和 35.6%), 而最大的是密码子第三位(分别为 96.7%和 98.1%), 可见密码子第三位碱基的替换速率较快。

从 *COI* 基因碱基替换的统计结果可以看出, R 的平均值是 0.79, 颠换大于转换。密码子不同位点的碱基替换也表现出一定差异。密码子第三位发生碱基替换的频率明显的高于第一、二位点。这可能是由于密码子第三位承担较小的进化压力所致。

利用 MEGA4.1 统计 56 种直翅目昆虫的 *COI* 基因密码子使用情况, 包括密码子使用频率以及相对同义密码子使用频率 (RSCU)。可以看出 NNU 和 NNA 密码子的使用频率相当高, 这说明同义密码子的使用与密码子第三位的碱基组成紧密相关。当氨基酸同时存在第三位点为 A 和 U 的同义密码子时, A 的使用频率要比 U 大的多, 如: 甘氨酸(Gly)的 GGA(2.63) 和 GGU(0.92), 缬氨酸(Val)的 GUA(2.22)和 GUU(1.4)。而从 COI 基因序列组成统计也可以看出, 密码子第三位的 A+T 含量高达 84.9%, 远远高于第一、二位点, 说明密码子的摆动性主要发生在第三位。

一般直翅目昆虫线粒体基因组中 13 个蛋白质编码基因的多数基因起始密码子均为通用的 ATN 起始密码子, 但 *COI* 基因起始密码子呈现多样性。云南卡蝗 *COI* 的起始密码子为标准起始密码子 ATC, 东方蝼蛄 *COI* 的起始密码子为标准的 ATG, 摩门螽斯、日本蚤蝼、短额负蝗和威廉剑角蝗为 CCG, 黄脸油葫芦与疑钩额螽均为 TTA, 斑腿勐腊蝗为 ACC, 非洲飞蝗具有特殊四联起始密码子 ATTA。

COI 基因的终止密码子包括两类, 第一类是完整的终止密码子 TAA 或 TAG; 第二类是不完整的终止密码子 T 或 TA, 例如: 疑钩额螽为 TAA, 非洲飞蝗为 TAG, 摩门螽斯为不完整的终止密码子 T。

56 条直翅目 *COI* 基因编码的 522 个氨基酸中, 保守位点有 207 个(39.7%), 变异位点有 308 个(59.0%), 简约信息位点有 168 个(32.2%), 自裔位点有 140(26.8%)。所有的 COI 蛋白均由 20 种氨基酸组成, 其中亮氨酸(Leu)与异亮氨酸(Ile)的含量最高, 分别为 11.86、9.74。半胱氨酸(Cys)的含量最少, 平均为 0.14, 甚至在有些物种中未出现 (如陈氏掩耳螽、笨棘颈螽等), 说明 COI 的氨基酸组成存在一定的偏向性。

2.2　系统发育分析

密码子不同位点的替换饱和分析显示, 三个位点的转换和颠换均与 P-distance 呈线性关系, 说明这些序列之间未达到饱和, 系统发育信号强, 可以用于系统发育研究。

基于核苷酸序列构建的系统发生树(NJ 树、MP 树、ML 树、BI 树)显示, 直翅目与外群完全分开, 基部都分为两支：一支由螽亚目昆虫聚在一起形成, 另一支由蝗亚目昆虫聚在一起形成。但是这两个分支内部的系统学关系在不同系统树间存在较大差异。

加权 MP 树和 NJ 树中郑氏比蜢均位于蝗亚目的基部, 蚤蝼科都位于螽亚目的基部; ML 树(图 1)和 BI 树(图 2)也包括两支, 一支是螽亚目, 一支是蝗亚目, 蚤蝼科都位于蝗亚目的基部。NJ 树、MP 树和 ML 树中, 分支末端的支持度多数大于 70%, 其他分支的支持度普遍小于 70%。

蝗亚目分支的内部差异较大, ML 树与 BI 树中相同的分支是：蚤蝼总科位于蝗亚目基部, 依次分出的是蜢总科、癞蝗科。不同分支：ML 树中瘤锥蝗科、大腹蝗科与锥头蝗科形成一个分支, 再与斑翅蝗科组成姊妹群, 在癞蝗科之后分出来; 剑角蝗科、斑腿蝗科、网翅蝗科及槌角蝗科 4 科形成一大支, 分支末端的支持度普遍较高, 但科之间的关系比较混乱, 而且分支支持度都比较低。BI 树中剑角蝗科、斑腿蝗科、斑翅蝗科、网翅蝗科及槌角蝗科 5 科形成一个大支, 瘤锥蝗科、大腹蝗科与锥头蝗科形成一个分支, 再与上面 5 科形成的大支形成姊妹群, 斑腿蝗科的中华稻蝗和小卵翅蝗与剑角蝗科的中华蚱蜢和威廉剑角蝗聚在一起。

螽亚目分支内部比较一致。ML 树与 BI 树均由

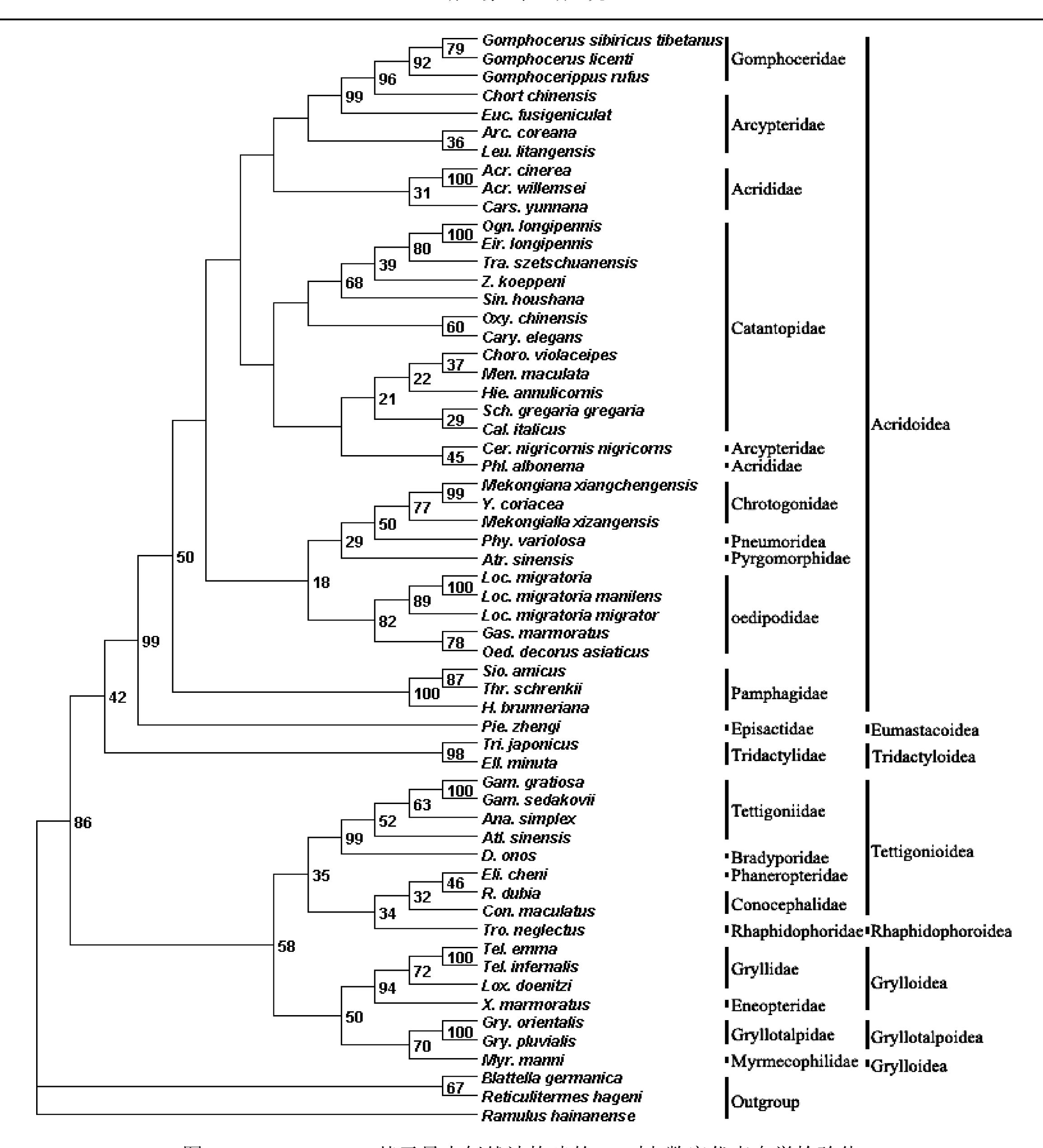


图 1 PAUP*4.1 b10 基于最大似然法构建的 ML 树(数字代表自举检验值)

Fig.1 Phylogenetic tree based on maximum likelihood method using software PAUP*4.0 b10

两大支组成：1) 蚁蟋科的 *Myr. manni* 与蝼蛄科 2 个种形成一支, 再与 (蟋蟀科, 蛣蟋科)形成姊妹群; 2)螽蟖科 4 个种与硕螽科的 *D. onos* 形成一支, 露螽科、草螽科与驼螽科形成一支, 这两支组成一个大分支。加权 MP 树和 NJ 树中蚤蝼总科位于螽亚目基部, 但这一分支的分支支持度并不高。

通过 SH 和 KH 检验对 4 种建树方法(NJ、MP、ML、BI)构建的系统发育树进行了评估, 结果显示基于 *COI* 基因全序列构建的四种系统发育树 SH 及 KH 检验的 *P* 值均大于临界值 0.05, 即 4 种系统树之间无显著差异。

基于氨基酸序列构建的 MP 树和 ML 树, 可以完全区分开直翅目与外群, 蝗亚目和螽亚目两个大支也很清楚, 并且支持度都较高; (蚤蝼总科, 蜢总科)位于螽亚目的基部, 螽亚目内部分支清晰, 与基于核酸序列建立的 ML 中的分支一致; 蝗亚目内部分支很乱, 除个别分支与 DNA 序列建立的树一致外, 其他类群交织在一起, 不能解析总科及以下水平的系统发育关系。但是对基于氨基酸序列构建的系统树和基于核苷酸序列构建的系统树进行比较

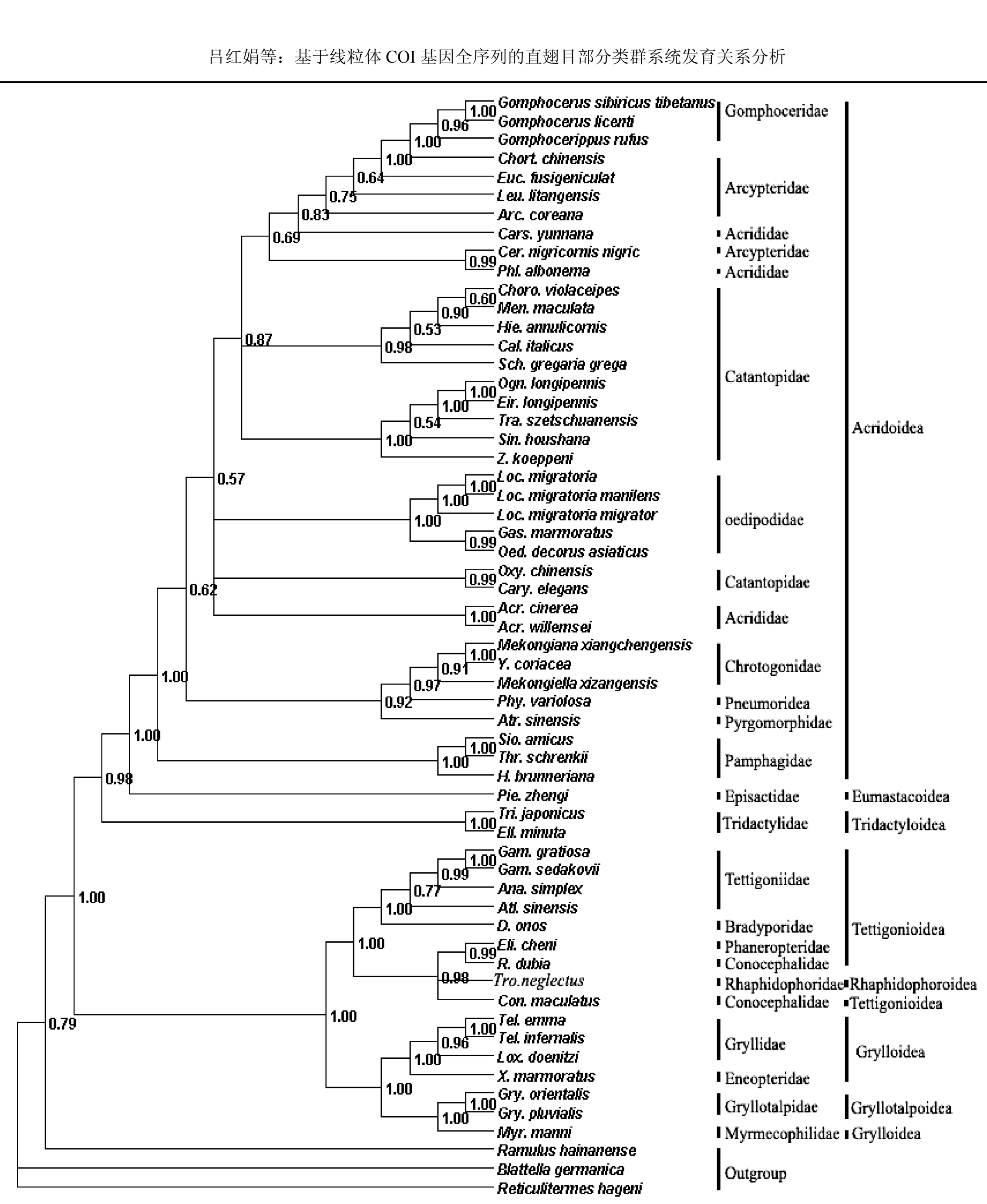


图 2　基于贝叶斯法重建的系统发育树
Fig.2　Phylogenetic tree based on Bayesian method

可以发现：基于 DNA 序列构建的系统树末端分支的支持度普遍在 70%以上, 其余分支的支持度普遍较低; 基于氨基酸序列构建的系统树末端分支的支持度较高, 而基部节点的支持度也普遍较高。

利用*COI*条形码的通用引物 (Pan et al, 2006), 上游引物：5'-*TYTCAACAAAYCAYAARGATATTGG*- 3'; 下游引物：5'-*TAAACTTCWGGRTGWCCAAAR-AATCA*-3', 分别与 59 条 *COI* 全长序列比对, 得到 658 bp 的序列。构建的系统发育树与 *COI* 全长序列构建的系统树基部的差异较大, 其末端分支大部分支持度较高, 但是其他节点的支持度普遍比基于 *COI* 全长构建的系统树的支持度低。统计简约信息位点发现 *COI* 全长中 Pi，占 50.0%, 而 658 bp 的片段中 Pi，占 49.7%, 没有太大的差异。

2.3　物种间遗传距离分析

由于从系统发育树得到的各科之间及总科间分支的支持度普遍不高, 故本研究采用了组间遗传距离作为研究总科间及科间关系的参考。在 MEGA4.1 中以 P 距离计算各组之间的遗传距离(对于空位选择成对删除, 以转换加颠换计算相对遗传

距离)。

依照基于核苷酸序列构建的ML树的分支将系统树上的蝗总科划分为8个组, 螽蟖总科分为4个组, 蟋蟀总科分为3个组。蝗总科的8个组为：1剑角蝗科、2斑腿蝗科、3斑翅蝗科、4网翅蝗科、5槌角蝗科、6瘤锥蝗科和锥头蝗科、7癞蝗科、8大腹蝗科。这8组间的遗传距离在0.107～0.198之间, 瘤锥蝗科和锥头蝗科所在组与其余各组间的遗传距离最大, 均在0.178～0.198之间, 槌角蝗科与网翅蝗科的遗传距离最小, 为0.107。螽蟖总科的4个组为：1螽蟖科、2硕螽科、3露螽科、4草螽科, 这4组之间的遗传距离在0.173～0.218之间。蟋蟀总科的3个组为：1蟋蟀科、2蛣蟋科、3蚁蟋科, 其中蟋蟀科与蛣蟋科的遗传距离最小，为0.176, 蚁蟋科与蟋蟀科、蛣蟋科的遗传距离分别为0.216和0.227。

在总科级阶元之间的遗传距离方面, 还是按照ML树的分支将蝗亚目分为4个组：1蝗总科、2蜢总科、3蚤蝼总科、 4大腹蝗科。这4组之间除蚤蝼总科外, 其他3组间的遗传距离在0.189～0.232之间, 大腹蝗科与蝗总科的距离最小，为0.189, 蚤蝼总科与其余各组间的遗传距离都比较大, 在0.245～0.265之间变化。螽亚目分为4个组：1螽蟖总科、2驼螽总科、3蟋蟀总科、4蝼蛄总科, 其中螽蟖总科与驼螽总科的遗传距离最小, 为0.202, 蟋蟀总科与蝼蛄总科的遗传距离是0.211, 蟋蟀总科和蝼蛄总科与其余各组间的遗传距离均在0.220左右。

2.4 *COI*基因的功效性评价

密码子第三位点的简约信息位点最多(96.7%), 密码子第一位点次之(37.0%), 由此推断 *COI* 基因序列中第三、一位点对系统树的分支贡献最大。为了进一步验证这一结论的准确性, 本研究应用TreeRot.v3和PAUP4.0 b10软件计算合一树的PBS值, 结果显示：对于合一树的所有分支, 密码子第三位点的PBS值最大(AVG 6008.00), 第一位点次之(AVG 1699.00), 第二位点PBS值最小(AVG 550.00), 并且三个位点的PBS值差异很显著。说明密码子第三、一位点对系统树的分支贡献大, 而第二位点对系统树的分支贡献最小。这也进一步验证了*COI*基因序列中简约信息位点越多, 对系统树的分支贡献越大的结论。此外, 不同长度的*COI*基因片段计算出的PBS值不同, 并且*COI*基因的长度与PBS几乎呈正相关关系 (即基因序列越长, PBS值越大), 而*COI*基因平均长度都在1 500 bp左右, 在13个蛋白质编码基因中仅次于ND5(1 700 bp左右), 这也意味着较长的基因可能含有较多的信息位点。

一般来说, 不同DNA片段由于其进化速率不同, 其系统发育信号不一样, 解决系统发育问题所需的最少位点数就不同。快速进化的片段对于新近分歧的类群有较强的信号, 可用较短的序列; 而对系统树基部分枝来说有很弱的信号, 需要较长的序列。并且对于大多数序列数据, 其系统发育推论的稳定性和可靠性随序列数据的增加而加强, 本研究也验证了以上说法。

从基于核苷酸序列及氨基酸序列构建的系统树的比较可以得出结论：*COI*的核苷酸序列进化较快, 含有的变异信息更多, 更适合用来区分亚科及以下水平的系统发育关系; COI的氨基酸序列进化较慢, 较为保守, 更适合区分目、亚目水平的系统发育关系。

3 讨 论

3.1 不同处理方法对系统发育关系重建的影响

在进行简约法分析时, 对转换与颠换的加权和对密码子3个不同位点的加权得到的系统树是有差异的。基于氨基酸序列重建的系统发育树只能区分直翅目、蝗亚目以及螽亚目的单系性, 对于总科、科间及以下阶元均不能很好地区分。可能是由于COI氨基酸序列含有的信息较少, 只适合研究远缘物种的进化关系。PAUP*4.0 b10和Treefinder软件构建的ML树与MrBayes软件构建的贝叶斯树比较一致, 均能较好的解析直翅目类群的系统发育关系。此外, 本研究为了证实同一基因的不同片段对系统发育树的影响, 我们将*COI*全长基因划分成不同的片段 (包括从5'端、3'端分别取650 bp左右的片段和根据*COI*条形码的通用引物比对出的658 bp左右的片段), 对划分出来的3个片段分别建树, 然后与*COI*全长序列建立的系统树做比较, 发现从5'端截取的片段和 *COI* 条形码序列构建的系统树与*COI* 全长基因在末端分支上较一致, 而其余分支的支持度只有基于*COI*全长基因构建的系统树最高。

3.2 基于 *COI* 基因的直翅目各高级阶元间的系统发育关系

本研究使用 *COI* 基因全长序列重建了直翅目部分类群的系统发生树, 从不同方法构建的系统发

生树来看，直翅目的单系性能够得到支持，蝗亚目和螽亚目的单系性也能够得到支持。Fenn et al (2008)利用线粒体基因组全序列数据获得的系统发育树也支持直翅目及其两个亚目的单系性。ML 树与贝叶斯树中螽亚目各类群的系统发育关系较一致，加权 MP 树和 NJ 树与之不同的是蚤蝼总科位于螽亚目基部。蝗亚目内部的系统发育关系有较大的差异。

除蚤蝼总科外，蝗亚目的其余物种在各系统树中均聚在一起，构成单系群，这些类群可以分成 3 部分，1)蜢总科的 *Pie. zhengi* 位于基部，2)瘤锥蝗科、锥头蝗科和大腹蝗科组成一支，3)包括癞蝗科在内的其余物种。分支中各总科和科级阶元的划分与 Otte et al (2011)系统基本一致，即剑角蝗科、斑腿蝗科、斑翅蝗科、网翅蝗科、槌角蝗科归到蝗科，瘤锥蝗科和锥头蝗科归为锥头蝗总科，癞蝗科单独成为一科。

所有的系统树中，网翅蝗科与槌角蝗科各自都不构成单系，但是两科的代表物种总是合并构成一个单系分枝，支持 Otte et al (2011)分类系统中的网翅蝗科与槌角蝗科归为一个亚科，作为槌角蝗亚科。ML 树中斑翅蝗科代表物种聚成一个单系群，并与瘤锥蝗科、大腹蝗科与锥头蝗科的分支组成姊妹群。在夏凯龄的分类系统中，剑角蝗科一直被看作是单系群，包含 6 个亚科 (Xia, 1958)，但是根据 *COI* 基因重建的 3 棵系统树得出的系统发生关系与夏凯龄的分类系统差别较大，都不支持剑角蝗科是单系群，而且近年来的多个研究 (Sun et al, 2006)对其单系性争议较大。斑腿蝗科的单系性也不被支持。Liu & Jiang (2005)用 18S rDNA 对蝗总科分子系统研究中，同样发现网翅蝗科、剑角蝗科、斑腿蝗科无法形成单系群。而除 ML 树外的其余系统树中，剑角蝗科、斑腿蝗科、网翅蝗科、斑翅蝗科、槌角蝗科 5 科共同组成一个单系群，5 科间的遗传距离在 0.107～0.153 之间变化，与其他科相比遗传距离较小，支持这 5 科合并为一科，即蝗科。这也与 Otte et al (2011)系统的划分一致。国外普遍认同的 Otte 系统 (Otte, 1997)从蝗总科中划分出了锥头蝗总科和大腹蝗总科，而在本研究中瘤锥蝗科、大腹蝗科和锥头蝗科聚在一起，无法从蝗总科中分出来。

螽亚目在各系统发育树中均分为 2 支，蟋蟀总科和蝼蛄科组成一支，剩余类群聚为一支。传统的分类系统一般认为蟋蟀科和蝼蛄科有较近的进化关系，有的分类系统将蝼蛄科作为总科，与蟋蟀总科并列 (Zheng & Gui, 1999)；有的分类系统将蝼蛄科视为蟋蟀总科下的一个科 (Zhang et al, 2008)。结合遗传距离的计算结果，蟋蟀总科与蝼蛄科遗传距离是 0.211，比与其余各组间的遗传距离小，推测两者的进化关系较近。但由于在 ML 树中这个分支的支持度不高(50.0)，所以不能完全确定蟋蟀总科和蝼蛄科的分类关系，建议补充更多物种后做一步研究。

螽蟖科与硕螽科 *D.onos* 聚在一起，科间的遗传距离为 0.173，亲缘关系较近；草螽科与露螽科相互交织聚成一支；螽蟖总科中蟋蟀科与蛣蟋科的遗传距离最小 0.176，在系统树上也总是聚在一起，蚁蟋科与蟋蟀科、蛣蟋科的遗传距离分别为 0.216、0.227，且蚁蟋科与蝼蛄科总是聚在一起，分支支持度也都较高。

本研究基于 *COI* 基因全序列，应用 4 种建树方法重建了直翅目部分类群的系统发生树，由于选取的物种有限，并不能准确解析直翅目内部各个阶元的系统发育关系。所有系统发生树除末端分支的支持度较高外，其余的分支支持度普遍偏低，不足以准确解决较高阶元的系统发育关系，但是与基于 16*S* rRNA、18*S* rRNA 建立的系统发生树有相似的分支，因此也能够为直翅目昆虫系统发育研究提供一些有效的信息。根据系统树的分支支持度仍可以推测：*COI* 基因更适合于分析亲缘关系较近的亚科及以下类群的系统关系，氨基酸序列更适合分析目及亚目高级阶元的系统发育关系。研究也证实了将各物种 *COI* 基因间的遗传距离作为直翅目划分科级阶元的工具有一定的参考意义。

参考文献：

Abascal F, Posada D, Zardoya R. 2007. MtArt: A new model of amino acid replacement for Arthropoda [J]. *Mol Biol Evol*, **24**(1): 1-5.

Abascal F, Zardoya R, Posada D. 2009. ProtTest: Selection of best-fit models of protein evolution version 2.4 [J]. *Bioinformatics*, **21**(9): 2104-2105.

Bonfield JK, Staden R. 2002. ZTR: A new format for DNA sequence trace data[J]. *Bioinformatics*, **18**(1): 3-10.

Ding FM, Huang Y. 2008. Molecular evolution and phylogenetic analysis of

some species of Oedipodidae (Orthoptera: Caelifera) in China based on complete mitochondrial ND2 gene[J]. *Acta Entomol Sin,* **51**(1): 55-60. [丁方美, 黄原. 2008. 基于线粒体ND2基因的中国斑翅蝗科部分种类分子系统学研究(直翅目: 蝗总科). 昆虫学报, **51**(1): 55-60.]

Fenn JD, Song H, Cameron SL, Whiting MF. 2008. A preliminary mitochondrial genome phylogeny of Orthoptera (Insecta) and approaches to maximizing phylogenetic signal found within mitochondrial genome data [J]. *Mol Phylogenet Evol,* **49**(1): 59-68.

Huang DW, Meier R, Todd PA. Chou LM. 2008. Slow mitochondrial *COI* sequence evolution at the base of the metazoan tree and its implications for DNA barcoding [J]. *J Mol Evol,* **66**(2): 167-174.

Kumar S, Nei M, Dudley J, Tamura KK. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [J]. *Brief Bioinform,* **9**(4): 299-306.

Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. 2007. Clustal W and Clustal X version 2.0 [J]. *Bioinformatics,* **23**(21): 2947-2948.

Liang G, Li T, Yin ZH, Lei FM. 2008. Molecular phylogenetic analysis of some Fringillidae species based on mitochondrial CoI gene sequences[J]. *Zool Res,* **29**(15):465-475. [梁刚, 李涛, 尹祚华, 雷富民. 2008. 利用CoI基因序列对雀科鸟类的分子系统发育关系初探. 动物学研究, **29**(15):465-475.]

Liu DF, Jiang GF. 2005. Molecular phylogenetic analysis of Acridoidea based on 18S rDNA with a discussion on its taxonomic system [J]. *Acta Entomol Sin,* **48**(2): 232-241. [刘殿锋, 蒋国芳. 2005. 基于18S rDNA的蝗总科分子系统发育关系研究及分类系统探讨. 昆虫学报, **48**(2): 232-241.]

Liu XW, Jin XB. 1992-1993. List of Chinese Stenopelmatoidea and Terrigonioidea (Grylloptera). Contr. Shanghai Inst Entomol, 11: 99-118. [刘宪伟, 金杏宝. 1992-1993. 中国螽蟖名录. 昆虫学研究集刊, 11: 99-118.]

Liu Y, Song Y, Li XY. 2010. DNA barcode technology in insect molecular application about mitochondrial COI gene [J]. *Plant Quarantine,* (2): 46-50. [刘勇, 宋毓, 李晓宇. 2010. 基于线粒体COI基因的DNA条形码技术在昆虫分子鉴定中的应用. 植物检疫, (2): 46-50.]

Nylander JAA. 2004. MrModeltest v2.2. Program distributed by the author[EB/OL]. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Otte D, Eades DC, Cigliano MM. Orthoptera Species File Online[EB/OL]. Version2.0/4.0. [2011-03-01]. < http://Orthoptera.SpeciesFile.org>.

Pan CY, Hu J, Zhang X, Huang Y. 2006. The DNA barcoding application of mtDNA COI genes in seven species of Catantopidae (Orthoptera) [J]. *Entomotaxonomia,* **26**(2): 103-111. [潘程莹, 胡婧, 张霞, 黄原. 2006. 斑腿蝗科Catantopidae七种蝗虫线粒体COI基因的DNA条形码研究. 昆虫分类学报, **26**(2): 103-111.]

Posada D. 2003. Using Modeltest and PAUP* to select a model of nucleotide substitution [J]. *Curr Protoc Bioinform*, 6. 5. 1-6. 5. 14.

Reeves JH. 1992. Heterogeneity in the substitution process of amino acid sites of proteins coded for by mitochondrial DNA [J]. *J Mol Evol,* **35**(1): 17-31.

Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models [J]. *Bioinformatics,* **19**(12): 1572-1574.

Simon C, Frati F, Beckenbach A, Crespi B, Liu H Flook P. 1994. Evolution, weighting, and phylogenetic utility of mitochondrial gene sequences and a compilation of conserved polymerase chain reaction primers [J]. *Ann Entomol Soc Am,* **87**(6): 651-701.

Sorenson MD, Franzosa EA. 2007. TreeRot. v3 [M]. Boston, MA: Boston University.

Stamatakis A. 2006. RAxML-VI-HPC: Maximum likelihood-based phylogenetic analyses with thousands of taxa and mixed models [J]. *Bioinformatics,* **22**(21): 2688-2690.

Sun ZL, Jiang GF, Huo GM, Liu DF. 2006. A phylogenetic analysis of six genera of Acrididae and monophyly of Acrididae in China using 16S rDNA sequences (Orthoptera, Acridoidea) [J]. *Acta Zool Sin,* **52**(2): 302-308. [孙正莉, 蒋国芳, 霍光明, 刘殿锋. 2006. 基于16S rDNA序列探讨中国剑角蝗科的单系性及其六属的系统发育关系. 动物学报, **52**(2): 302-308.]

Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony. (*and Other Methods) [EB/OL]. Version 4.0b10. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates.

Wang BX, Yang LF. 2002. Phylogenetic utilities of mitochondrial DNA sequences in the study of insect systematics[J]. *Entomol Knowl,* **39**(2): 89-91. [王备新, 杨莲芳. 2002. 线粒体DNA序列特点与昆虫系统学研究. 昆虫知识, **39**(2): 89-91.]

Wang NX, Feng X, Jiang GF, Fang N, Xuan WJ. 2008. Molecular phylogenetic analysis of five subfamilies of the Acrididae (Orthoptera:Acridoidea) based on the mitochondrial cytochrome b and cytochrome c oxidase subunit I gene sequences [J]. *Acta Entomol Sin,* **51**(11): 1187-1195.

Wang X, Huang B. 2006. Advancement of DNA Barcoding in Animal Taxonomy [J]. *Biotechnol Bull,* (4): 67-71. [王鑫, 黄兵. 2006. DNA条形编码技术在动物分类中的研究进展. 生物技术通报, (4): 67-71.]

Wang XY, Zhou ZJ, Huang Y, Shi FM. 2011. The phylogenetic relationships of higher Orthopteran categories inferred from 18S rRNA gene sequences [J]. *Acta Zootaxon Sin,* **36**(3): 627-638. [汪晓阳, 周志军, 黄原, 石福明. 2011. 基于18S rRNA基因序列的直翅目主要类群系统发育关系研究. 动物分类学报, **36**(3): 627-638.]

Xia KL. 1958. Taxonomic Essentials on Acrididae in China[M]. Beijing: Science Press, 1-239. [夏凯龄. 1958. 中国蝗科分类概要. 北京: 科学出版社, 1-239.]

Yang DM, Lin Y. 2010. Application of mitochondrial DNA gene order in molecular systematics of insects [J]. *Guangdong Agric Sci,* **37**(6): 188-190. [杨德明, 林杨. 2010. 线粒体DNA基因序列在昆虫分子系统学研究中的应用. 广东农业科学, **37**(6): 188-190.]

Yin XC. 1982. On the taxonomic system of Acridoidea from China [C]. *Acta Biologica Plateau Sinica*, (1): 69-99. [印象初. 1982. 中国蝗总科(Acridoidea)分类系统的研究. 高原生物学研究集刊, (1): 69-99.]

Zhang HJ, Huo KK, Chen R. 2008. Comparison of Xia's taxonomic systematics with Otte's [J]. *J North West Univ: Sci Online,* **6**(4): 0358. [张宏杰, 霍科科, 陈锐. 2008. 中国夏氏与 Daniel Otte蝗虫分类系统比较. 西北大学学报: 自然科学网络版, **6**(4): 0358.]

Zhang XJ. 2009. Study on Molecular Phylogeny of Acridoidae Based on 28SrDNA and COI Gene [D]. S.M. thesis, Shaanxi Normal University. [张小静. 2009. 基于28SrDNA和COI基因序列的蝗总科部分种类分子系统学研究. 陕西师范大学.]

Zheng LY, Gui H. 1999. Insect Classification [M]. Nanjing: Nanjing Normal University Press. [郑乐怡, 归鸿. 1999. 昆虫分类. 南京: 南京师范大学出版社, 254-257.]

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 329−336　　CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research　　DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03329

舟山小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区序列变异的遗传多样性分析

郑文娟, 来育洪, 尤昕煜, 秦茜晗, 朱世华*

(宁波大学 科学技术学院, 浙江 宁波 315212)

摘要：小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*)为我国重要海产经济鱼类之一, 过度捕捞和环境污染等因素造成其资源日益衰退。研究小黄鱼种群遗传结构对其资源的保护及其可持续利用有十分重要的意义。该研究采用聚合酶链式反应(PCR)技术对浙江舟山附近海域小黄鱼种群 53 个个体的 mtDNA D-loop 区全序列进行扩增, 序列长度在 795~801 bp 之间, 长度差异不大。采用 Clustal X1.83、MEGA3.1、DnaSP4.0 等生物信息学软件进行遗传多样性分析, 结果显示：53 条小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区的 T、C、A 和 G 碱基平均含量分别为 30.3%、23.1%、32.3% 和 14.3%, 排除 13 处核苷酸的插入或缺失后, 共检测到 93 处转换和颠换位点, 约占分析序列总长度的 11.6%, 其中包括 53 个单一多态位点和 40 个简约信息位点, 共确定了 52 种单倍型, 单倍型多样性(*hd*)为 0.9993, 单倍型间的平均遗传距离为 0.012, 转换/颠换平均值为 4.305, 平均核苷酸差异数(*k*)为 9.73875, 核苷酸多样性(*π*)为 0.01233, 表明舟山小黄鱼遗传多样性处于中等水平。

关键词：线粒体 DNA; D-loop 区; 小黄鱼; 遗传多样性; 舟山
中图分类号：Q349; Q953.3; Q959.483　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：0254-5853-(2012)03-0329-08

Genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* in Zhoushan based on mitochondrial DNA D-loop region sequences

ZHENG Wen-Juan, LAI Yu-Hong, YOU Xin-Yu, QIN Xi-Han, ZHU Shi-Hua*

(*College of Science & Technology*, *Ningbo University*, *Ningbo* 315212, *China*)

Abstract: *Pseudosciaena polyactis* is an economically important species of marine fish in China that is currently declining due to overexploitation, environmental pollution and related factors. Research in to the genetic structure of *Pseudosciaena polyactis* populations plays a key role in protecting and promoting sustainable utilization. We collected 53 individuals of *Pseudosciaena polyactis* from Zhoushan, Zhejiang and sequenced and amplified the mitochondrial DNA (mtDNA) D-loop region using Polymerase Chain Reactions (PCR). The sequence length of the 53 individuals ranged from 795 to 801 bp. The sequences were analyzed by Clustal X1.83, MEGA3.1 and DnaSP4.0. The results showed that the average base content of T, C, A, G was 30.3%, 23.1%, 32.3% and 14.3%, respectively and there were 93 transition or transversion sites, including 53 single nucleotide mutation sites and 40 parsimony informative sites, which accounted for 11.6% of the length of the analyzed sequences. In total, we identified 52 haplotypes and found haplotype diversity (*hd*) of 0.9993, average number of nucleotide differences were 9.73875 (*k*), and nucleotide diversity (*π*) of 0.01233. The average genetic distance of haplotypes was 0.012, and the average transition/transversion was 4.305. Based on mitochondrial DNA D-loop region sequences, these results indicate that the genetic diversity of the *Pseudosciaena polyactis* population in Zhoushan is currently at a medium level.

Key words: Mitochondrial DNA; D-loop region; *Pseudosciaena polyactis*; Genetic diversity; Zhoushan

小黄鱼(*Pseudosciaena polyactis*), 又名小鲜(浙江)、小黄瓜(福建)、黄花鱼(山东、河北和辽宁)等, 隶属于鲈形目(Perciformes)石首鱼科(Sciaenidae)黄鱼属(*Pseudosciaena Bleeker*)(Lin, 2004), 广泛分布于渤海、黄海、东海。曾与大黄鱼、带鱼、墨鱼并称为我国“四大渔业”, 是我国最重要的海洋渔业经济种类之一。20 世纪 60 年代后, 由于受过度捕捞和环境恶化等影响, 小黄鱼资源经历了严重衰退; 自

收稿日期：2011-11-15；接受日期：2012-02-21
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn
第一作者简介：郑文娟, 女, 研究生, 主要从事鱼类分子遗传学

20 世纪 90 年代开始, 由于产卵场禁捕和伏季休渔制度的有效实施, 其产量有所恢复, 但小黄鱼种群目前却呈现个体小型化、低龄化、体质量生长拐点提前等种质资源衰退问题(Lin et al, 2004)。目前国内外小黄鱼的研究主要在于渔业资源分布、生物学特性、生态习性、饵料等几个方面(Chen et al, 2004; Chen et al, 2010; Huang et al, 2010; Jin, 1996; Lin et al, 2004; Yan et al, 2006), 而对小黄鱼种质资源的系统研究甚少(Meng et al, 2003; Peng et al, 2010; Xu et al, 2005)。

线粒体 DNA(mitochondrial DNA, mtDNA)中的 D-loop 区，即控制区(control region, CR)为非编码区, 受到选择压力较小, 因此，积累了较多的突变, 如碱基替换、插入、缺失, 以及众多的串联重复序列等(Tang et al, 2005), 所以在种群遗传学分析中得到普遍应用(Agnèse et al, 2006; Xia et al, 2006; Yan et al, 2009)。本文通过对舟山海域的小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区全长序列的测定, 来探讨其种群遗传结构, 为今后长期可持续利用和保护小黄鱼资源奠定良好的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小黄鱼种群样本随机采集于舟山沈家门的 3 条渔船, 试验鱼取其肌肉组织, 用 95%酒精固定, 运回实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取和 PCR 扩增 从保存的样本中抽取 53 个样本, 基因组 DNA 从保存于 95%酒精的肌肉样品中提取, 采用苯酚/氯仿抽提法(Zhu et al, 2006)。用 Nanodrop 2000 测 DNA 的浓度和质量, 于-20 ℃保存备用。从 GenBank 下载小黄鱼线粒体基因全长序列, 用 Oligo 软件设计 D-loop 区 PCR 扩增的引物为：DLF1(5'-*TCA GAG CAC CGG TCT TGT A*-3'), DLR1(5'-*GGG AGC TAT TAG GGC ATT C*-3')。PCR 反应体系为 50 µL, 其中：Buffer 缓冲液(含 Mg^{2+})5 µL, dNTPs(各 2.5 mmol/L)5 µL, Taq 酶(2 U)0.5 µL, 上、下游引物(20 µmol/L)各 1 µL, 模板 DNA(约为 100 ng)1 µL, 灭菌蒸馏水 36.5 µL。PCR 反应条件为：94 ℃预变性 4 min; 94 ℃变性 1 min, 55 ℃退火 45 s, 72 ℃延伸 1'30'', 共 34 个循环; 72 ℃延伸 15 min。反应设立不含 DNA 模板的空白对照, 扩增产物经 1%的琼脂糖凝胶电泳验证。

PCR 产物电泳割胶回收, 用凝胶纯化试剂盒(上海生工)纯化, 与 pUCm-T 载体(上海生工)连接, 转化感受态细胞 DH5α, 筛选阳性克隆子, 扩大培养后提取质粒, 用 M13 引物在自动测序仪(Applied Biosystems 3730, 上海英俊)正反双向测序, 以保证所测序列的准确性。

1.2.2 数据处理与分析 测序后的序列, 对比 GenBank 中小黄鱼的线粒体 DNA 全序列, 以 $tRNA^{Pro}$ 结束和 $tRNA^{Phe}$ 起点找到 D-loop 区序列的起点和终点, 得到 D-loop 区序列后，使用 Clustal X1.83 软件进行对位排列, 并在 SEAVIEW 程序中对序列辅以手工校正。用 MEGA3.1 计算碱基组成及应用 Kimura 双参数法计算遗传距离(Kumar et al, 1994), 并用该软件的邻接法(neighbor-joining, NJ)构建小黄鱼各单倍型间系统发育关系树, 以大黄鱼(*Pseudosciaena crocea*)为外类群, 以 Kimura 双参数法为替代模型, 系统树分支的置信度采用自展法(bootstrap analysis, BP)重复检测 1 000 次。利用 DnaSP4.0 软件统计单倍型及多态位点(S)、计算单倍型多样性(hd), 平均核苷酸差异数(k)及核苷酸多样性(π)。用 Arlequin 3.11 软件(Excoffier et al, 2005)计算 Tajima's D 和 Fu's Fs 值(1 000 次重复随机抽样重排后进行显著性检验), 并进行核苷酸不配对分布(mismatch distribution), 并获得 τ 值, 来检测舟山小黄鱼种群的历史动态。群体历史扩张时间 T 用参数 $\tau=2ut$ 进行估算(Rogers & Harpending, 1992), 其中 τ 是扩张时间参数; $u=2\ \mu k$, μ 为变异速率, k 表示序列长度; t 表示自扩张以来所经历的代数; 扩张时间 $T=t\times$代时, 代时由研究对象的性成熟年龄决定(Liu et al, 2009)。本研究中, 世代时间设置为 1 年(Lin et al, 2004), 控制区分化速率分别采用 3%~10%/MY (million year)(Lee et al, 1995)。基于简约法原理用 TCS(Clement et al, 2000)构建单倍型网络图(network)。

2 结 果

2.1 线粒体 DNA D-loop 区全序列特征

本实验小黄鱼种群的 mtDNA D-loop 区序列上传至 GenBank，序列号为 JQ692234~JQ692286。53 个小黄鱼个体的线粒体 DNA D-loop 区全长介于 795~801 bp 之间, 碱基长度变化不大。经 MEGA3.1 软件分析, 该序列的 T、C、A 和 G 碱基的平均含量分别为 30.3%、23.1%、32.3%和 14.3%,

A+T(62.6%)的含量远高于G+C(37.4%)的含量, 这个现象与其他鱼类的控制区的碱基含量相似(Zhu et al, 2007)。

2.2 种群遗传多样性分析

利用MEGA3.1的Kimura双参数法计算遗传距离, 结果显示 53 个小黄鱼个体间的遗传距离为

表 1　小黄鱼 53 个个体 mtDNA D-loop 序列的多态位点

Tab. 1　Polymorphic sites of mtDNA D-loop sequences in the 53 individuals of *Pseudosciaena polyactis*

	111111111	1111111111	2222222222	2222223333	3333333445	5555555555	5666666777	7777777777	777
	11133788	9022233334	4445556779	0222333344	4556770011	2333458222	2333334668	9137788002	2334455666	779
	3436768368	3127801372	3890376081	6468256745	6596344689	7189669131	3023589369	3484657785	9017969789	056
H1	TATATCAACA	ATAATCGCCA	GTGTACTTAC	TAGTTGGGGA	ACAACTCGAT	CAAGTACTAA	TTCCTGATGC	GTTTCCTCTA	AGCGCGTGGA	AAA
H2	....	....	....	...GG.....	......T...	..G......C	....CA....	....	....	...
H3	....	....	....	........AG	........GC	C	....C.....	....	...A......	...
H4	....	....	A...G.C...	.......C..	....	C	....C.....	....	....	...
H5	....	....	A.........	....	....	..G......C	....CA....	....	....	...
H6	....	C.........	A...G.C...	.GA.......	GA..T.....	A.G......C	....C.....	....	.....A....	...
H7	....C.....	....	A.........	....	....	C	....C.....	....	....	...
H8	....	C.........	A...G.....	..A.......	.A..T...GC	A.......GC	....C.....	....	....	...
H9	....	.C..C.....	A.........	....	....	..G......C	.CT.CA....	....	G.........	...
H10	....	C.........	A..CG.C...	..A.....A.	.A.GT...GC	A.G......C	....C.....	....	....	...
H11	....	....	A.........	....	....	C	....CA....	....	.....A....	...
H12	........T.	....	A.........	....	....	C	....CA....	....A.....	....	...
H13	....	.........G	A.........	....	....	......T..C	....C.....	....A.....	....	...
H14	.......G..	....	A.........	....	....	C	....C.....	....	........T.	...
H15	....	....	A.....C...	......A...	....	C	....C.....	A.........	....	...
H16	....	C.........	A...G.....	....	.AGGT..AGC	A.G.....GC	....C.....	....	....	...
H17	....	.....T..T.	A.........	C.........	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H18	....	....	A........T	....	....	..GA.....C	....C.....	.CA.......	....	...
H19	....	C.........	A.........	....	.A..T...GC	A........C	..T.C.....	....	....	...
H20	....	....	A.....C...	....	....	C	....CA....	A.........	....	...
H21	....	C.........	A.........	..A.......	.A.GT...GC	A.G.....GC	....C.....	......C...	....	...
H22	.......G..	........T.	A.........	..A.......	....	..G......C	.....A....	....	...A......	...
H23	....	....	A...G.....	..A.......	....	C	..T.C.....	....	....	...
H24	....	....	ACA.......	....	....	C	....C.....	....	....	...
H25	....	........T.	ACA.......	....	.A........	A.......GC	....C.....	A.........	....	...
H26	....	......A...	A.....C...	..A.......	....	C	...TC.....	.........G	...C......	...
H27	....	.C..C..A..	A.........	....	....	C	..T.CA....	....	.A........	G..
H28	....	....	A.A...C...	....	....	..G......C	C.T.C....T	.C........	.........G	...
H29	....	....	....	....	........GC	C	....C.....	....	....	...
H30	....	....	A.........	....	....	..G......C	....C.....	.......A..	....T.....	...
H31	....	....	A.......G.	....	.A......GC	A........C	..T.C.....	....	....	...
H32	....	.C..C.....	A.....C...	....	....	C	.CT.CA....	....	........T.	...
H33	.........G	........T.	A.........	....	.AG.TC....	AG..CG...C	....C.....	....	....	...
H34	....	....	A.........	..A.......	....	C	...TC.....	....	...C......	...
H35	.......G..	........T.	A.........	....	.AGGT...GC	A.G......C	....C...A.	....	....	...
H36	....	..G.....T.	A.........	....	.AGGT.....	A.G.....TC	....C.....	....	....	...
H37	....	....C.....	A.........	....	....	C	..T.C.....	....A.....	....	.G.
H38	...G......	..G.......	A.........	..A.......	....	C	...TC..C..	....	...C......	...
H39	....	.........G	A.........	....	........GC	C	....CA....	....	....	...
H40	CT........	....	A.....C...	....	....	C	....CA....	....	....	...
H41	CT........	....	A...G.....	..A.......	....	C	....CAG...	.......A..	.........G	...
H42	....	........T.	A.........	....	....	C	....C.....	........C.	....	...
H43	....	C.........	....G.....	....	.A.GT.....	A.G......C	..T.C.....	....	...A......	...
H44	..C.......	....	A...G.CC..	....	....	.......C.C	....C.....	.C........	......C...	...
H45	....	...G......	A...G.....	..A.......	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H46	.....A....	....	....	....	....	C	....C.....	....	....	...
H47	....	C.........	A.........	..A.......	.A.GT.....	A.G.....GC	C...C.....	...C......	....	...
H48	....	....C.....	A...G.....	..A..A....	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H49	....	....	A...G.....	..A.......	....	C	....C.....	.......A..	....	...
H50	....	........T.	A....T....	....	.AG.T.....	..G.....GC	....C.....	....	...A......	...
H51	....	....	A.........	....	....	..G......C	....CA....	....	..T.......	...
H52	......C...	....	A.....C...	....	....	..G......C	....C.....	.....A....	.......A..	..G

0.000~0.026, 平均遗传距离为 0.012, 转换/颠换平均值为 4.305。DnaSP4.0 软件分析显示, 53 个个体中共检测到 93 个多态位点, 各个多态位点见表 1, 占分析位点总数的 11.6%, 其中 53 处位点为单一多态位点, 占 6.6%; 其他 38 处均为简约信息位点, 占 4.7%; 另有 2 处简约信息位点, 即 423 nt 和 747 nt, 为三核苷酸间的变异。所有的突变位点均为两核苷酸或三核苷酸间的变异, 并未发现四核苷酸间的变异。此外, 53 个个体中共检测到 13 个插入或缺失位点, 占分析位点总数的 1.6%, 共检测出 52 个单倍型, 除了两个个体(1-18 与 2-11)间有一个共享单倍型 H15 外, 其余测定的小黄鱼个体均拥有各自的单倍型。单倍型多样性(*hd*)为 0.9993, 平均核苷酸差异数(k)为 9.73875, 核苷酸多样性(π)为 0.01233。

2.3 种群遗传结构

以邻接法(NJ)构建系统发育树, 以大黄鱼为外类群对舟山小黄鱼种群的 52 个单倍型进行系统发育分析, 枝上的数值是 1 000 次重复抽样检验的置信度值(仅显示支持率大于 50%的数据)(图 1)。图中显示, 52 个单倍型基本各成一支, 遗传距离特近的单倍型聚成一簇, 其中 1-18 和 2-11 共享单倍型 H15, 它们聚成一簇, 置信度高达 96%。网络亲缘关系图与系统发育树基本一致(图 2), 以单倍型 H5 为中心, 推测这个单倍型可能较为原始, 再以 H5 衍生出 5 分支, 每个支系内的单元型之间多为 1~5 步的突变次数, 而 2 个支系之间最高达 31 步的突变次数。

2.4 种群历史动态

根据群体碱基错配分布曲线是否呈现多峰或单峰型, 以及 Tajima's D 和 Fu's Fs 值中性检验是否显著, 判定舟山小黄鱼种群在过去是否发生了群体扩张。结果显示, 小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区的单倍型核苷酸不配对分布曲线基本表现出明显的单峰泊松分布, 并且与群体扩张模型下的预期分布相吻合(图 3), Tajima's D 值为−1.84772 (P=0.013<0.05), Fu's Fs=−24.49575 (P=0.000<0.05), 结合三者说明舟山小黄鱼种群可能经过群体扩张。本研究中, τ=8.507, k=803, 代时取 1, 计算得到 T 值为 0.088~0.026 MY, 说明小黄鱼群体扩张时间约为更新世晚期(冰河期)。

2.5 舟山小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区各区段的遗传多样性

根据小黄鱼的线粒体 DNA D-loop 区结构(Liu et al, 2010)的区段划分, 通过序列比对, 1~178 nt 为终止序列区, 179~559 nt 为中央保守区, 560~803 nt 为保守序列区, 各个区段的遗传多样性指数见表 2,

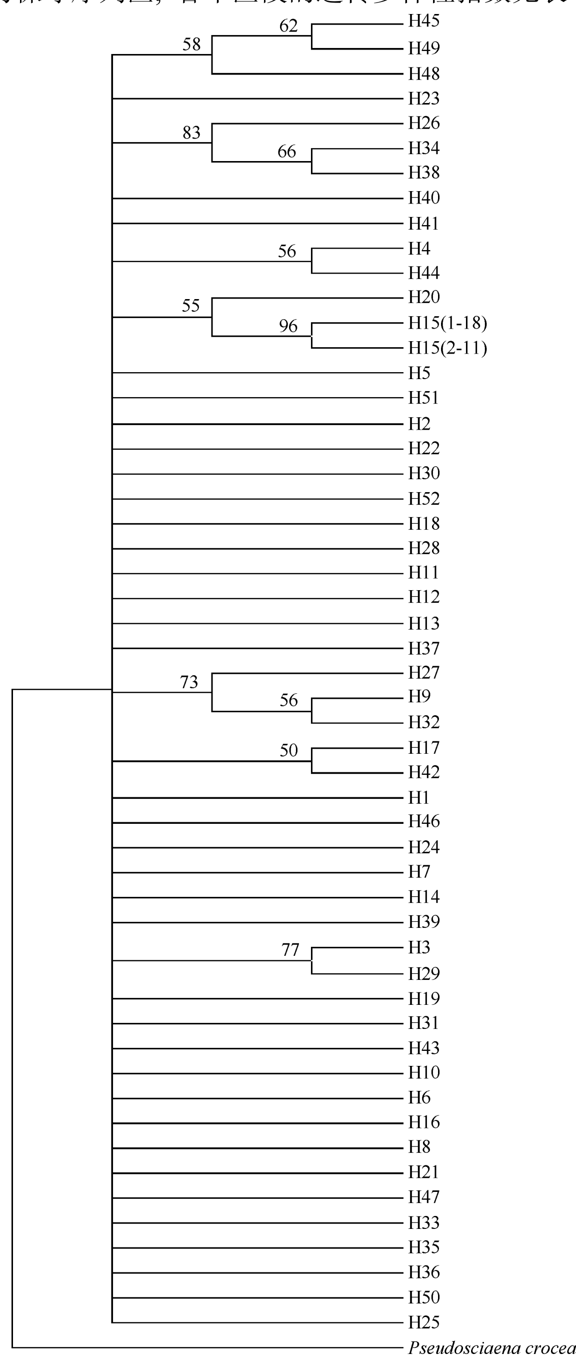


图 1 基于小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区全序列通过邻接法构建的分子系统树

Fig. 1 Molecular phylogenetic tree on complete control region sequences of *Pseudosciaena polyactis* constructed by Neighbour-Joining method of MEGA Version 3.1 with Bootstrap Test (1 000 replications)

从表中看出小黄鱼种群中终止序列区是整个 D-loop 区变异最多的区段, 其次是中央保守区, 最保守的是保守序列区。

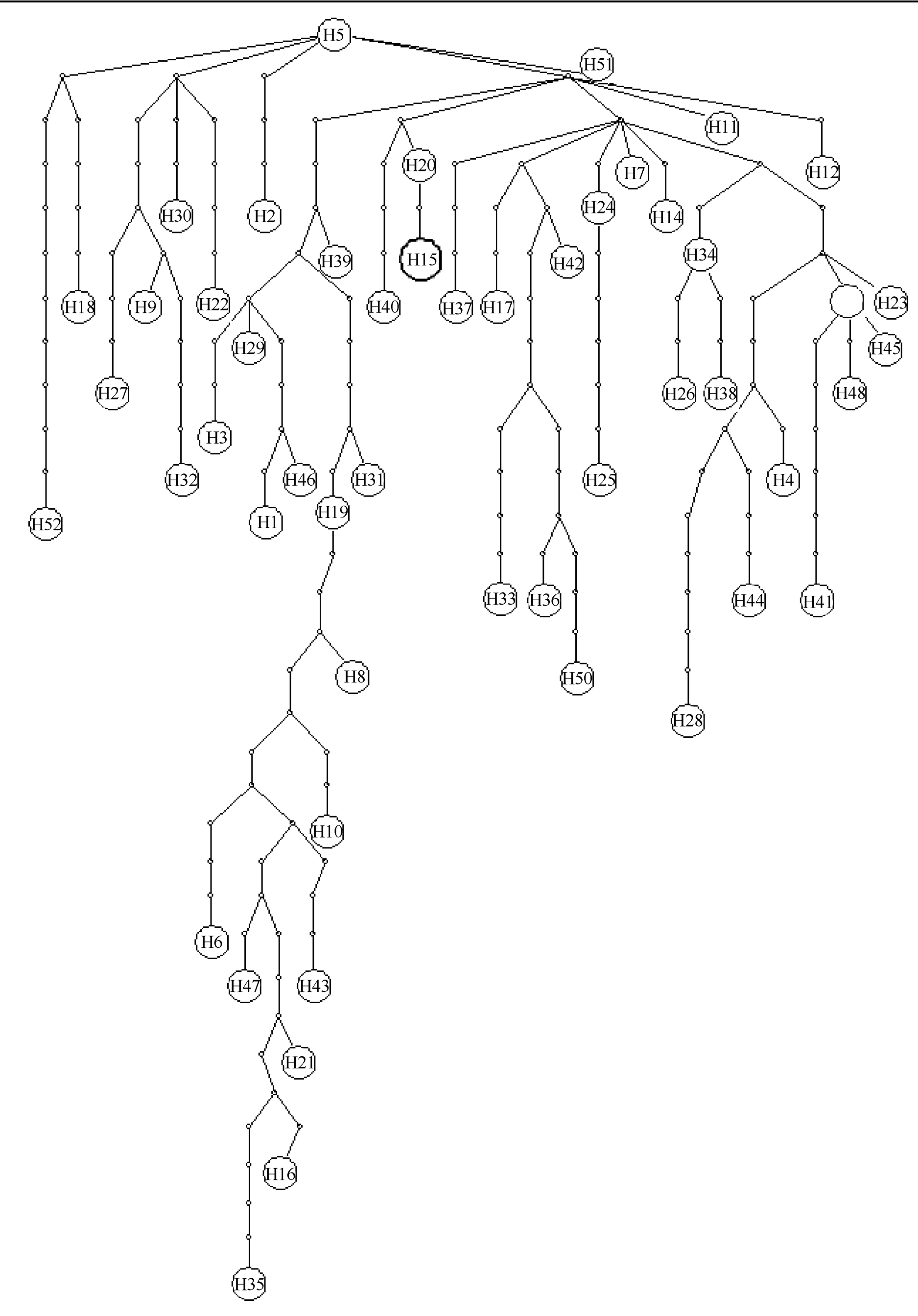


图 2　基于统计简约法构建的单倍型网络图

Fig. 2　Statistical parsimony network of haplotypes

连接单倍型的线表示一步变异；圆圈大小大约表示该单倍型出现的次数。

Each mutational step is shown as a line while the size of circles roughly represents the numbers of individuals.

3　讨　论

遗传多样性(genetic diversity)又称为基因多样性(gene diversity), 通过遗传多样性的研究能从本质上揭示物种多样性的起源、变异和进化。从遗传学和进化角度看, 一个物种的遗传多样性高低与其适应能力、生存能力和进化潜力密切相关(Jiang et al, 2003)。

2001 年对采自黄海和东海 5 个海区的 48 个个体小黄鱼进行随机扩增 DNA 多态性(RAPD), 研究表明, 从 40 个 10 bp 引物中选取 20 个用于群体遗传多样性分析, 共检测出 145 个位点, 其中 132 个(91.03%)显多态性。用 Shannon 多样性指数量化的平均遗传多态度为 1.93(1.50~2.44), 群体内和群体

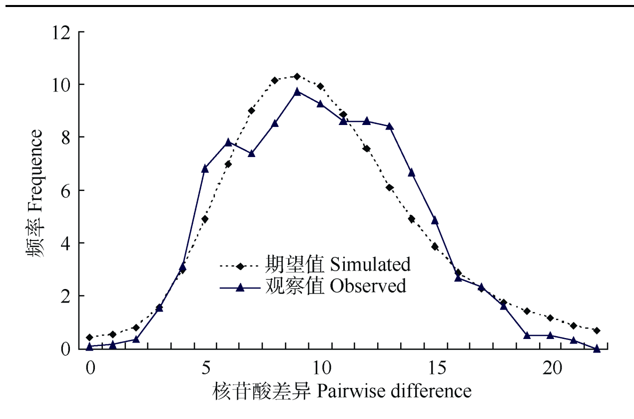


图 3　舟山小黄鱼种群单倍型的不配对分布图
Fig. 3　Mismatch distributions of the haplotypes of *Pseudosciaena polyactis* in Zhoushan

间的遗传变异比例分别为 69%和 31%；群体间的平均遗传相似度和遗传距离分别为 0.9139 和 0.0861(Meng et al, 2003)。这个数据通过横向比较当时 RAPD 检测到的其他海洋鱼类的多态位点百分率发现，小黄鱼比其他一些海洋鱼类，例如梭鱼(*Liza haematocheila*)(Quan et al, 2000)、条纹鲈(*Morone saxatilis*)(Bielawski & Pumo, 1997)、真鲷(*Pagrus major*)(Jiang et al, 2004)的野生或养殖群体都要高。2005 年采用 ISSR 技术对黄海南部小黄鱼群体进行遗传多样性分析，64 条带中具多态性的条带，占 65.63%，群体内的遗传差异达 0.2187, Shannon 多样性值为 0.1888，表明小黄鱼具有丰富的遗传多样性，这与采用 RAPD 方法对小黄鱼群体研究得出的结果一致(Xu et al, 2005)。

表 2　舟山小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区各区段的遗传多样性指数
Tab. 2　The index of genetic diversity of each section of mitochondrial DNA D-loop region for *Pseudosciaena polyactis* population in Zhoushan

区段 Section	单倍型数 (h)	单倍型多样性 (hd)	多态位点 (S)	平均核苷酸差异数 (k)	核苷酸多样性指数 (π)
终止序列区 Termination associated sequence domain (TAS)	37	0.978	29	2.878	0.01645
中央保守区 Central conserved domain (CD)	40	0.983	38	5.152	0.01385
保守序列区 Conserved sequence block domain (CSB)	24	0.874	26	1.708	0.00703

h=Number of Haplotypes; *hd*=Haplotype diversity; *S*=Number of polymorphic sites; *k*=Average number of nucleotide differences; π=Nucleotide diversity.

衡量一个种群 mtDNA 的遗传变异有两个重要指标：单倍型间的核苷酸多态性(π)和平均遗传距离(Zhou et al, 2006)。通过对长江口九段沙、钱塘江口、舟山等 3 个地点 35 尾刀鲚(*Coilia nasus*)的 mtDNA 控制区全序列的变异和遗传结构研究，结果显示，长江口邻近水域刀鲚的平均单倍型多样性(*hd*)为 0.9983，平均核苷酸多样性(π)为 0.0262，表现出丰富的遗传多样性和较高的进化潜力(Yang et al, 2008)。采用聚合酶链式反应(PCR)技术测定分析了闽-粤东族、岱衢族大黄鱼群体 47 个个体的线粒体 DNA 控制区基因序列，结果表明，所有个体的平均单倍型多样性(*hd*)为 0.470，核苷酸多样性(π)为 0.00650，群体遗传变异处于较低水平(Mao et al, 2010)。与以上相近水域的刀鲚和大黄鱼种群相比，再结合 Grant & Bowen 综述各种海洋鱼类的线粒体 DNA 单倍型多样性(*hd*)为 0.11~1.00，核苷酸多样性(π)为 0.0008~0.0320(Grant & Bowen, 1998)，本研究中，舟山小黄鱼种群从单倍型多样性(*hd*)来看，在所检测的 53 个个体中，除两个个体共享一个单倍型外，其余个体均独占一个单倍型，平均单倍型多样性(*hd*)为 0.9993，核苷酸多样性(π=0.01233)，说明舟山小黄鱼种群具有较高的单倍型多样性，但从核苷酸多样性(π)来看，发现舟山小黄鱼的遗传多样性只处于中等水平。从其不高的遗传距离更说明了这一结论，小黄鱼的遗传距离值只有 0.012，而根据 Shaklee et al(1982)提出鱼类在属、种和种群三级水平上的遗传距离值分别为 0.90、0.30 和 0.05。这与 2010 年采用线粒体 Cyt*b* 分析了中国近海丹东、营口、舟山、温州和福州 32 尾小黄鱼的遗传变异，共检测到 26 个单倍型，单倍型多样性(*hd*)为 0.984，核苷酸多态性(π)为 0.00395，呈现出较高的单倍型多样性和较低的核苷酸多样性(Peng et al, 2010)相一致,本研究的核苷酸多态性(π)指数远高于彭博等所测的数据，是因为线粒体 DNA 的 D-loop 区的变异远高于保守的 Cyt*b*。

若核苷酸错配曲线呈现单峰分布，且 Tajima's *D* 值显著偏离中性检验，则群体在过去经受了扩张，反之，群体大小保持稳定(Liu et al, 2009)。本研究中，

小黄鱼线粒体 DNA D-loop 区的单倍型核苷酸不配对分布基本表现出明显的单峰泊松分布，Tajima's *D* 值为−1.84772(*P*=0.013<0.05)，中性统计检验显著的 Tajima's *D* 值可能是自然选择的作用、群体扩张或瓶颈效应等原因造成的(Tajima, 1989; Zhou & Wang, 2004)，Fu(1997)发现 *Fs* 检验对群体扩张非常敏感，群体扩张通常产生绝对值较大的负的 *Fs* 值，小黄鱼种群的 Fu's *Fs*=−24.49575(*P*=0.000<0.05)，这说明小黄鱼群体确实经历了群体扩张。通过计算 τ 值我们估计小黄鱼种群扩张时期约在 8.8 万~2.6 万年前，处于更新世晚期(冰河期)。许多研究结果表明，海洋鱼类的种群扩张也大多处于这一时期(Liu et al, 2006; Niu et al, 2011; Yang et al, 2008)。因为第四纪末期的更新世晚期有几次冰期与间冰期旋回，曾引起海平面的升降，现生海洋物种的分布及种群遗传结构大多受到这种冰期旋回的影响。Niu et al(2011)研究认为，更新世后的海平面上升事件对东海鱼类的 mtDNA 遗传结构具有重要影响。本研究中，我们发现小黄鱼种群经过扩张后，只是积累了单倍型多态性，但却还未能积累核苷酸序列的多样性。

通过分析小黄鱼种群的线粒体 DNA D-loop 区各区段的遗传多样性，结果发现小黄鱼种群中终止序列区是整个 D-loop 区变异最多的区段，其次是中央保守区，最保守的是保守序列区。这与大部分文献阐述认为终止序列区是线粒体 DNA D-loop 区中变异最大的部分相一致，但与中央保守区是线粒体 DNA D-loop 区中最为保守的部分存在分歧，不过与本研究相同的是长江口鲚属鱼类 mt DNA D-loop 区中也发现保守区的碱基序列比中央保守区更为保守(Zhu et al, 2008)。因此猜测，保守区和中央保守区谁更为保守，要依据不同物种具体而定。

20 世纪 80 年代中后期小黄鱼鱼汛消失，为保护小黄鱼等经济鱼类，从 1981 年起在小黄鱼的最大产卵场--吕泗渔场实行了休渔规定，东海区小黄鱼资源逐步得到稳定与好转，到 1995 年在东海和黄海全面实行伏季休渔制度，东海区小黄鱼的年渔获量开始出现了持续增加之势，但在强大的捕捞压力下仍显得不足(Lin et al, 2004)。研究表明，对比伏季休渔制度实施前后的渔业资源常规监测资料分析可见，伏季休渔实施前的 1992—1994 年的 7—9 月，小黄鱼的渔获组成主要由当年生幼鱼和 1 龄以上鱼两股群体组成，当龄鱼的幼鱼比例为 43.14%，而伏季休渔制度实施后的 2000 年 7—9 月，小黄鱼的渔获组成绝大多数为当年生幼鱼，其比例高达 74.64%(Chen et al, 2004)。这一现象表明，虽然伏季休渔制度的实施对东海区小黄鱼资源数量的恢复与相对稳定起到了至关重要的作用，但这种作用主要表现为对小黄鱼幼鱼群体的短时间保护，而对其剩余群体的保护作用难以体现。目前小黄鱼的渔获群体利用质量不仅没有因伏季休渔制度而带来根本性的好转，恰恰相反，由于捕捞强度的逐年增加，其群体生物学表征反而进一步表现为严重恶化的趋势(Lin et al, 2004)。结合本研究中舟山小黄鱼种群的遗传多样性只处于中等水平来看，必须采取更科学、更严格的管理措施, 2009 年底，“吕泗渔场小黄鱼银鲳国家级水产种质资源保护区”获准建立，这将为小黄鱼资源的保护和利用提供有利的平台，如此期望小黄鱼资源走向可持续发展的道路。

参考文献：

Agnèse JF, Zentz F, Legros O, Sellos D. 2006. Phylogenetic relationships and phylogeography of the Killifish species of the subgenus *Chromaphyosemion* (Radda, 1971) in West Africa, inferred from mitochondrial DNA sequences [J]. *Mol Phylogenet Evol,* **40**(2): 332-346.

Bielawski JP, Pumo DE. 1997. Randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of Atlantic coast striped bass [J]. *Heredity,* **78**(1): 32-40.

Chen JH, Lin LS, Ling JZ, Li JS, Ding FY. 2004. Effects of summer close season and rational utilization on redlip croaker (*Larimichthys polyactis* Bleeker) resource in the East China Sea region [J]. *Chn J Fish Sci,* **11**(6): 554-560. [程家骅，林龙山，凌建忠，李建生，丁峰元. 2004. 东海区小黄鱼伏季休渔效果及其资源合理利用探讨[J]. 中国水产科学, 11(6): 554-560.]

Chen JJ, Xu ZL, Chen XZ. 2010. The spatial distribution pattern of fishing ground for small yellow croaker in China Seas [J]. *J Fish Chn,* **34**(2): 236-244. [陈佳杰，徐兆礼，陈雪忠. 2010. 我国沿海小黄鱼渔场的空间格局 [J]. 水产学报, **34**(2): 236-244.]

Clement M, Posada D, Crandall KA. 2000. TCS: A computer program to estimate gene genealogies [J]. *Mol Ecol,* **9**(10): 1657-1659.

Excoffier L, Laval G, Schneider S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis [J]. *Evol Bioinform Online,* **1**(1): 47-50.

Fu YX. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection [J]. *Genetics,* **147**(2): 915-925.

Grant WS, Bowen BW. 1998. Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: Insights from sardines and anchovies and lessons for conservation [J]. *J Hered*, **89**(5): 415-426.

Huang H, Cheng QQ, Huang H. 2010. Recent progress and prospect of small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis* Bleeker) [J]. *Mod Fish Inf,* **25**(9): 9-12. [黄昊，程起群，黄昊. 2010. 小黄鱼生物学研究进展[J]. 现代渔业信息, **25**(9): 9-12.]

Jiang SG, Yang HR, Su TF, Gong SY. 2004. Genetic diversity of three geographical populations of *Pagrosomus major* revealed by RAPD analysis [J]. *J Fish Chn,* **28**(3): 334-338. [江世贵，杨慧荣，苏天凤，龚世园. 2004. 3 个不同地理群体真鲷遗传变异的 RAPD 分析 [J]. 水产学报, **28**(3): 334-338.]

Jiang YY, Kong XY, Yu ZN, Zhuang ZM, Jin XS. 2003. Genetic diversity of *Scomberomorus niphonius* in the Yellow Sea revealed by mtDNA D-loop sequence [J]. *J Fish Sci Chn,* **10**(3): 177-183. [姜艳艳, 孔晓瑜, 喻子牛, 庄志猛, 金显仕. 2003. 黄海蓝点马鲛 mtDNA D-loop 序列变异分析 [J]. 中国水产科学, **10**(3): 177-183.]

Jin XS. 1996. Ecology and population dynamics of small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis* bleeker) in the Yellow Sea [J]. *J Fish Sci Chn,* **3**(1): 32-46. [金显仕. 1996. 黄海小黄鱼 (*Pseudosciaena polyactis*) 生态和种群动态的研究 [J]. 中国水产科学, **3**(1): 32-46.]

Kumar S, Tamura K, Nei M. 1994. MEGA: molecular evolutionary genetics analysis software for microcomputers [J]. *Cabios,* **10**(2): 189-191.

Lee WJ, Conroy J, Howell WH, Kocher TD. 1995. Structure and evolution of teleost mitochondrial control regions [J]. *J Mol Evol,* **41**(1): 54-66.

Lin LS. 2004. Analysis on extant abundance of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis* in the East China Sea [J]. *Mar Fish,* **26**(1): 18-23. [林龙山. 2004. 东海区小黄鱼现存资源量分析[J]. 海洋渔业, **26**(1): 18-23.]

Lin LS, Chen JH, Ren YP, Ling JZ. 2004. Analysis of population biology of small yellow croaker *Pseudosciaena polyactis* in the East China Sea region [J]. *J Fish Sci Chn,* **11**(4): 333-338. [林龙山, 程家骅, 任一平, 凌建忠. 2004. 东海区小黄鱼种群生物学特性的分析 [J]. 中国水产科学, **11**(4): 333-338.]

Liu JX, Gao TX, Zhuang ZM, Jin XS, Yokogawa K, Zhang YP. 2006. Late Pleistocene divergence and subsequent population expansion of two closely related fish species, Japanese anchovy (*Engraulis japonicus*) and Australian anchovy (*Engraulis australis*) [J]. *Mol Phylogent Evol,* **40**(3): 712-723.

Liu SF, Wu RX, Zhu L, Zhuang ZM. 2010. Complete sequence and gene organization of mitochondrial DNA of the small yellow croaker *Larimichthys polyactis* [J]. *Oceanol Limnol Sin,* **41**(6): 885-894. [柳淑芳, 吴仁协, 朱玲, 庄志猛. 2010. 小黄鱼 (*Larimichthys polyactis*) 线粒体基因组结构与特征 [J]. 海洋与湖沼, **41**(6): 885-894.]

Liu ZZ, Yang JQ, Wang ZQ, Tang WQ. 2009. Genetic structure and population history of *Beleophthalmus petinirostris* in Yangtze river estuary and its southern adjacent regions [J]. *Zool Res,* **30**(1): 1-10. [刘至治, 杨金权, 王正琦, 唐文乔. 2009. 长江口及其南部邻近地区大弹涂鱼种群遗传结构及种群历史分析[J]. 动物学研究, **30**(1): 1-10.]

Meng ZN, Zhuang ZM, Jin XS, Tang QS, Su YQ. 2003. Genetic diversity in small yellow croaker (*Pseudosciaena polyactis*) by RAPD analysis [J]. *Biodivers Sci,* **11**(3): 197-203. [蒙子宁, 庄志猛, 金显仕, 唐启升, 苏永全. 2003. 黄海和东海小黄鱼遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 生物多样性, **11**(3): 197-203.]

Mao Y, Jiang QF, Zeng HS, Wang J. 2010. Genetic diversity of *Pseudosciaena crocea* (Richardson) based on mitochondrial DNA control region sequences [J]. *J Xiamen Univ:Nat Sci,* **49**(3): 440-444. [毛勇, 蒋秋芬, 曾华嵩, 王军. 2010. 大黄鱼线粒体 DNA 控制区遗传多样性分析[J]. 厦门大学学报:自然科学版, **49**(3): 440-444.]

Niu SF, Su YQ, Wang J, Zhang LY, Zeng HS, Zhang M. 2011. Genetic polymorphism of mitochondrial control region and cyt *b* in *Trachurus japonicus* from Fujian coastal waters [J]. *J Fish Sci Chn,* **18**(1): 66-74. [牛素芳, 苏永全, 王军, 张丽艳, 曾华嵩, 张曼. 2011. 福建近海竹荚鱼线粒体 DNA 控制区和细胞色素 *b* 遗传多态性[J]. 中国水产科学, **18**(1): 66-74.]

Peng B, Zhang Q, Zhao S, Yue XL. 2010. Genetic diversity analysis of Larimichthys polyactis in coastal waters of China based on Cytochrome *b* gene [J]. *Guangdong Agric Sci,* **37**(2): 131-135. [彭博, 章群, 赵爽, 乐小亮. 2010. 中国近海小黄鱼遗传变异的细胞色素 *b* 序列分析 [J]. 广东农业科学, **37**(2): 131-135.]

Quan JX, Dai JX, Shen SD, Deng JY, Zhuang ZM. 2000. Genetic variation analysis of two mullet populations through randomly amplified polymorphic DNA(RAPD) method [J]. *Acta Oceanol Sin,* **22**(5): 82-87. [权洁霞, 戴继勋, 沈颂东, 邓景耀, 庄志猛. 2000. 梭鱼人工养殖群体与自然群体的随机扩增多态 DNA(RAPD)分析 [J]. 海洋学报, **22**(5): 82-85.]

Rogers AR, Harpending H. 1992. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences [J]. *Mol Biol Evol,* **9**(3): 552-569.

Shaklee JB, Tamaru CS, Waples RS. 1982. Speciation and evolution of marine fishes studied by the electrophoretic analysis of proteins [J]. *Pac Sci,* **36**(2): 141-157.

Tajima F. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism [J]. *Genet,* **123**(3): 585-595.

Tang QY, Liu HZ, Yang XP, Xiong BX. 2005. Studies on the structure of the mitochondrial DNA control region and Phylogenetic Relationships of the subfamily Botiinae [J]. *Acta Hydrobiol Sin,* **29**(6): 645-653. [唐琼英, 刘焕章, 杨秀平, 熊邦喜. 2005. 沙鳅亚科鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析及系统发育关系的研究 [J]. 水生生物学报, **29**(6): 645-653.]

Xia YZ, Sheng Y, Chen YY. 2006. DNA sequence variation in the mitochondrial control region of lenok (*Brachymystax lenok*) populations in China [J]. *Biodivers Sci,* **14**(1): 48-54. [夏颖哲, 盛岩, 陈宜瑜. 2006. 利用线粒体DNA控制区序列分析细鳞鲑种群的遗传结构 [J]. 生物多样性, **14**(1): 48-54.]

Xu GP, Zhong XM, Ding YP, Liu PT, Tang JH, Xu P. 2005. The research on genetic diversity of *Pseudosciaena polyactis* population from the southern part of the Yellow Sea [J]. *Mar Sci,* **29**(11): 34-38. [许广平, 仲霞铭, 丁亚平, 刘培庭, 汤建华, 许璞. 2005. 黄海南部小黄鱼群体遗传多样性研究[J]. 海洋科学, **29**(11): 34-38.]

Yan LP, Hu F, Ling JZ, Li SF. 2006. Study on age and growth of *Larimichthys polyactis* in the East China Sea [J]. *J Ocean Univ Chn,* **36**(1): 95-100. [严利平, 胡芬, 凌建忠, 李圣法. 2006. 东海北部和黄海南部小黄鱼年龄与生长的研究 [J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, **36**(1): 95-100.]

Yan XL, Tang WQ, Yang JQ. 2009. Population genetic structure of tapertail anchovy (*Coilia mystus*) in coastal waters of southeast China based on mtDNA control region sequences [J]. *Biodivers Sci,* **17**(2): 143-150. [阎雪岚, 唐文乔, 杨金权. 2009. 基于线粒体控制区的序列变异分析中国东南部沿海凤鲚种群遗传结构 [J]. 生物多样性, **17**(2): 143-150.]

Yang JQ, Hu XL, Tang WQ, Lin HD. 2008. mtDNA control region sequence variation and genetic diversity of *Coilia nasus* in Yangtze River estuary and its adjacent waters [J]. *Chn J Zool,* **43**(1): 8-15. [杨金权, 胡雪莲, 唐文乔, 林弘都. 2008. 长江口邻近水域刀鲚的线粒体控制区序列变异与遗传多样性[J]. 动物学杂志, **43**(1): 8-15.]

Zhou H, Li DQ, Zhang YG, Yi XR, Liu Y. 2006. Study on mitochondrial DNA genetic diversity of Tibetan Antelope [J]. *Hereditas,* **28**(3): 299-305. [周慧, 李迪强, 张于光, 易湘蓉, 刘毅. 2006. 藏羚羊 mtDNA D-loop 区遗传多样性研究[J]. 遗传, **28**(3): 299-305.]

Zhou Q, Wang W. 2004. Detecting natural selection at the DNA level [J]. *Zool Res*, **25**(1): 73-80. [周琦, 王文. 2004. DNA 水平自然选择作用的检测 [J]. 动物学研究, **25**(1): 73-80.]

Zhu SH, Yang YC, Shen XQ, Zou JX, Zheng WJ, Yu HW, Huang B. 2006. Phylogenetic relationships of Lutjanus inferred from mitochondrial cytochrome b sequences [J]. *Acta Zool Sin,* **52**(3): 514-521. [朱世华, 杨迎春, 沈锡权, 邹记兴, 郑文娟, 余红卫, 黄勃. 2006. 从细胞色素 b 基因序列探讨笛鲷属的分子系统发生关系 [J]. 动物学报, **52**(3): 514-521.]

Zhu SH, Zheng WJ, Zou JX, Yang YC, Shen XQ. 2007. Mitochondrial DNA control region structure and molecular phylogenetic relationship of carangidae[J]. *Zool Res,* **28**(6): 606-614. [朱世华, 郑文娟, 邹记兴, 杨迎春, 沈锡权. 2007. 鲹科鱼类线粒体 DNA 控制区结构及系统发育关系[J]. 动物学研究, **28**(6): 606-614.]

Zhu TJ, Yang JQ, Tang WQ. 2008. MtDNA control region sequence structure of the genus Coilia in Yangtze River estuary [J]. *J Shanghai Fish Univ,* **17**(2): 152-157. [诸廷俊, 杨金权, 唐文乔. 2008. 长江口鲚属鱼类线粒体 DNA 控制区结构分析[J]. 上海水产大学学报, **17**(2): 152-157.]

动 物 学 研 究 2012，Jun. 33(3): 337−342 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2012.03337

脑胶质瘤动物模型的研究及应用进展

朱惠芳, 张远旭, 赵旭东*

(中国科学院昆明动物研究所，云南 昆明 650223)

摘要：脑胶质瘤约占中枢神经肿瘤的一半, 临床治疗效果差。尤其是胶质母细胞瘤, 其恶性程度极高, 预后性差, 是威胁人类健康的主要恶性肿瘤之一，因此, 选择一种有效的动物模型是研究脑胶质瘤发病机制及其治疗方法的关键。随着分子生物学、遗传学的发展, 尤其是转基因小鼠, 以及其他越来越多模式生物的出现, 目前已建立了多种脑胶质瘤动物模型。该文将对目前所建立的各种脑胶质瘤动物模型予以综述。

关键词：脑胶质瘤; 动物模型; 转基因小鼠; 肿瘤干细胞
中图分类号：R739.41；R-332 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2012)03-0337-06

Animal models of human glioma: the progress of application and investigation

ZHU Hui-Fang, ZHANG Yuan-Xu, ZHAO Xu-Dong*

(*Kunming Institute of Zoology*, *Chinese Academy of Science*, *Kunming* 650223, *China*)

Abstract: The glioma accounts for half of the central nervous tumors, among which the glioblastoma multiforme (GBM) is one of the most aggressive and lethal brain tumors. The difficulties in glioma therapy indicate the need of appropriate animal models for preclinical studies. Benefiting from the development of molecular biology, genetics, and transgenic technology, variable animal models of glioma have been established. These animal models of human glioma are reviewed in this paper.

Key words: Glioma; Animal model; Transgenic mice; Tumor stem cell

脑胶质瘤是一类常见的颅内脑肿瘤，占颅内原发肿瘤的 35%～60%, 其中 50%为胶质母细胞瘤。对脑胶质瘤的临床治疗，其效果不佳，预后性差，是中枢神经脑肿瘤中发病率最高的原发性肿瘤。根据组织学特性, 脑胶质瘤主要分为星形胶质瘤、少突神经胶质瘤、室管膜瘤以及混合性胶质瘤等。根据世界卫生组织的分类系统,根据恶性程度，脑胶质瘤可分为 I～IV 四个等级。I 和 II 级胶质瘤恶性程度较低, 如星形胶质瘤；III 和 IV 级胶质瘤恶性程度很高, 如多型性神经胶母细胞瘤(glioblastoma multiform, GBM), 平均生存期仅一年左右, 是威胁人类生命健康最严重的恶性肿瘤之一。目前, 国内尚缺乏统一的脑肿瘤治疗规范, 当前的首选方案是手术摘除后辅以放射治疗, 联合使用替莫唑胺/卡氮芥、替尼泊苷化疗; 有条件的单位正在尝试间质内放化疗、光动力学治疗、免疫治疗、基因治疗、神经干细胞治疗等新兴治疗方式；但大多数治疗方法都有一定的副作用, 明显影响患者的生存质量与生存期, 因此，非常有必要建立合适的胶质瘤动物模型以研究胶质瘤的发病机制及治疗方案。根据获得肿瘤的来源，胶质瘤动物模型可分为诱发性脑胶质瘤模型、移植脑胶质瘤模型和转基因型脑胶质瘤模型(Du et al, 2005)，其各自用途不一, 标准各异, 现分别作如下介绍。

1 诱发肿瘤

人类所患肿瘤的 80%是由环境因素引起的, 动物的诱发肿瘤与人类肿瘤的发生情况近似, 且其成

收稿日期：2012-01-09；接受日期：2012-02-07
基金项目：自然科学基金面上项目（HUWE1 在卵巢癌发展中的作用）（81171960）
*通信作者(Corresponding author)，E-mail: zhaoxudong@mail.kiz.ac.cn

瘤经过较长的演变过程，是比较类似于人类肿瘤的动物模型。根据诱导剂的不同，脑胶质瘤动物模型又主要分为化学物质诱发和病毒诱发型。化学物质诱发的脑胶质瘤动物模型首见于利用甲基胆蒽制成丸剂植入小鼠脑内而成功诱发的脑胶质瘤。随后，又出现了新的致瘤物质，如烷化剂，尤其是甲基亚硝基脲和乙基亚硝基脲在中枢神经系统中具有很高的肿瘤诱发率(Koestner, 1990)。由乙基亚硝基脲诱发的 Fisher 大鼠脑胶质瘤模型，联合影像学的应用，是实验室模拟治疗低级胶质瘤的有效方法(Kish et al, 2001)。化学物质诱发的胶质瘤模型病程与人类胶质瘤较为相似，可被用于胶质瘤的移植试验等，但由于诱发肿瘤的遗传背景不清楚、种类不一、性质不稳定等因素,一定程度上限制了其应用。

通过对人类肿瘤的研究发现，很多肿瘤的发生都与病毒相关。病毒诱导肿瘤发生的可能机制有两个：其一是病毒通过将其基因组整合至宿主细胞基因组，导致宿主肿瘤相关基因的激活或抑癌基因的失活；其二是有些病毒基因内含有致癌基因，其编码的蛋白可促使宿主细胞发生癌变。目前应用于诱发脑胶质瘤动物模型的病毒有 BKV、JCV 和 RSV 等(Copeland et al, 1976; Krynska et al, 1999; London et al, 1978; Tabuchi et al, 1985)。London et al（1978）将 JCV 接种至 4 只成年猴子脑内，结果有 2 只生成胶质瘤；Tabuchi et al(1985)将 RSV 感染的鸡胚胎成纤维细胞注射至 15 只猴子脑内，结果有 11 只生成脑肿瘤，诱发效率达 73%,。病毒诱发模型是用于研究胶质瘤放/化疗效果的较好模型；但由于该胶质瘤模型动物表达某些病毒性肿瘤特异性抗原，在研究胶质瘤免疫疗法时，表现出很强的免疫原性，因此，在实际应用中并不 常用。

总之，应用化学物质和病毒在动物体内诱发胶质瘤可在很大程度上模拟自然状态下人类脑胶质瘤的发生，但诱发型模型遗传机制不清楚，生物学特征不稳定，导致该模型的应用也存在一定的局限性。

2 移植模型

移植性动物模型是目前应用最多的肿瘤模型，也是胶质瘤动物模型中使用最多的方法。随着免疫缺陷动物，如裸鼠和 SCID 鼠的出现，以及准确的立体定向、严格的无菌操作和浓缩细胞混悬液等技术的不断完善，大大提高了移植性动物模型建立的成功率。

根据肿瘤供体动物与受体动物之间种属的差异性，移植性肿瘤动物模型可分为异种移植和同种移植模型：（1）异种移植模型：免疫缺陷小鼠可大大降低移植过程中动物的免疫排斥反应，如人类胶质瘤细胞系 U251 皮下或颅内注射的裸鼠模型，可模拟人类胶质瘤的典型性特征，在组织病理学和免疫组织化学方面与人类胶质母细胞瘤极为相似(Furnari et al, 2007; Radaelli et al, 2009)；人类胶质瘤细胞系 U87 颅内注射的裸鼠模型虽然与人类胶质瘤不太相似，但却是用于研究抗肿瘤血管生成及胶质瘤高复发率的良好模型(Candolfi et al, 2007; de Vries et al, 2009; Radaelli et al, 2009)。（2）同种移植模型：同种移植动物模型的特点是肿瘤组织或细胞移植发生在同种或同系动物之间。常用的同种移植性胶质瘤动物模型有：小鼠胶质瘤细胞系 GL261 颅内注射正常小鼠模型；大鼠胶质瘤细胞系 C6 接种于 Long–Evans 大鼠模型 (Branle et al, 2002; Parsa et al, 2000)；大鼠胶质瘤细胞系 9L 脑纹状体注射 Wistar 大鼠模型(Stojiljkovic et al, 2003)。由于是在正常动物体内建立的肿瘤模型，其肿瘤生长特性和免疫应答等与人类胶质瘤较为接近，因此，应用该模型获得了很多基于免疫反应的治疗性实验数据(Maes & Van Gool, 2011)。

肿瘤干细胞假说的确立以及各种肿瘤干细胞株的成功分离为肿瘤移植动物模型的建立提供了新思路。在恶性程度较高的，如 IV 级胶质瘤中已经证实了胶质母细胞瘤干细胞存在(Ghods et al, 2007; Kondo et al, 2004; Pellegatta et al, 2006)。根据肿瘤干细胞的培养特性，从临床胶质瘤患者所获样本中已成功分离出胶质母细胞瘤干细胞(Bleau et al, 2008; Galli et al, 2004; Lee et al, 2006; Yuan et al, 2004)。Yuan et al（2004）将从胶质瘤患者中分离得到的胶质母细胞瘤干细胞接种至裸鼠脑内，直接导致了脑肿瘤的发生。此外，在耐常规放疗和化疗方面，胶质母细胞瘤干细胞移植模型也是很好的研究材料 (Bao et al, 2006; Galli et al, 2004)。胶质母细胞瘤移植虽然也能够在受体动物中导致胶质瘤的发生，但该模型不能用于靶向性治疗胶质母细胞瘤。相比较而言，胶质母细胞瘤干细胞移植模型能够重现原癌症的组织学、分子生物学等特征，能更真实地还原并反映人类胶质瘤的病理特征与分子生物学特性。该模型用于研究靶向性杀死胶质母细胞瘤

干细胞的方法将为治愈胶质母细胞瘤提供了可能性，是近年来兴起的一类新型肿瘤动物移植模型。

动物脑肿瘤的移植模型的主要优点是移植瘤株易存活，易建立及保存，且保留了较好的人脑胶质瘤的组织形态学、分子生物学及细胞生物学特性，是研究脑肿瘤放/化疗等的较好模型，但此模型对研究人脑胶质瘤的遗传机制帮助不大。

3 转基因型

肿瘤动物模型最早源于小鼠自发突变系或经致癌物诱导得到，但由于自发频率在自然状态下通常很低，且不可精确控制而限制了其应用，而传统的肿瘤移植模型也并不能充分地模拟人类肿瘤的发生。随着人们对癌基因激活和抑癌基因失活在肿瘤发生发展中作用认识的逐步加深，以及近年来转基因和基因剔除技术的发展，转基因肿瘤动物模型应运而生。

3.1 转基因胶质瘤动物模型的分子基础

随着各种癌症相关基因被发现，人们在基因水平对肿瘤发生机制的认识也逐步加深，很多人类肿瘤的发生通常伴随着癌基因的激活和抑癌基因的突变或缺失，胶质瘤的发生也不例外。*Rb* 和 *p53* 是调控细胞周期和细胞程序性死亡的关键性肿瘤抑制基因，在恶性胶质瘤患者中通常可检测到 *Rb* 基因和 *p53* 基因的突变(Watanabe et al, 2001)。这些基因的失活可表现为 *Cdk4* 和 *Cdk6* 基因的扩增和抑癌基因 $p16^{Ink4a}$ 的失活(Furnari et al, 2007)；而 p53 功能的缺失还可表现为 *Mdm2* 或 *Mdm4* 的扩增，或抑癌基因 $p14^{arf}$ 的失活(Zhu & Parada, 2002)。表皮生长因子受体 EGFR 的持续性激活是恶性胶质瘤发生的另一特征，EGFR 功能的变化通常表现为该基因的扩增、点突变和缺失，其中 EGFRvIII 突变体在恶性胶质瘤中出现地非常频繁，激活的 EGFR 通过抑制 GBM 细胞凋亡并加快其增殖(Aldape et al, 2004)。血小板来源的生长因子受体 PDGFR 和其配体 PDGF-A 及 PDGF-B 在很多胶质瘤细胞中通常也可检测到过表达(Zhu & Parada, 2002)。络氨酸蛋白激酶(tyrosine protein kinase, PTK)通过激活下游效应分子 Ras 和 PI3K 从而介导细胞生长和增殖，而这些蛋白的活性严格受到肿瘤抑制因子 pTen 和 NF-1 的调控，一旦后两者的缺失或突变发生，将导致胶质瘤的发生。

近年来，测序技术在基因组测序中的应用为分析胶质瘤细胞正常组织细胞中基因的差异提供了可能。2009 年，TCGA(The Cancer Genome Atlas Network)通过测序分析 206 例人 GBM 病例，比较样本中 DNA 拷贝数、基因表达量、DNA 甲基化修饰、以及基因突变或缺失等，最终在大多数 GBM 患者中发现 *PTK*/*Ras*/*PI3K*,*p53* 和 *Rb* 的突变，而 *p53*、*pTen*、*EGFR*、*CDKN2A*/*2B* 和 *NF-1* 是突变最频繁的基因 (Cancer Genome Atlas Research Network, 2008)。TCGA 公布的这些数据将为建立转基因胶质瘤动物模型提供更多的选择和可能性，而这些动物模型系统的建立又将更好地为研究胶质瘤的发生发展机制以及临床前期的试验服务。

3.2 转基因胶质瘤动物模型的建立方法

小鼠是最主要的转基因模式动物，被广泛的应用于生物科学和医药研究中。利用转基因技术已经建立了成熟的小鼠胶质瘤模型。这些转基因小鼠通过不同癌基因和抑癌基因的组合，实现肿瘤基因在小鼠中的过表达和抑癌基因的灭活，从而导致胶质瘤的发生。目前采用的方法主要有两大类：（1）传统的转基因小鼠类型；（2）病毒载体介导类型。

建立在受精卵和胚胎干细胞基础上的基因导入或敲除技术建立了很多动物肿瘤模型。然而，这些肿瘤模型与人类肿瘤仍然存在很大差异，如人类肿瘤是在出生后，随着环境因素的影响而发病的，而传统的转基因动物肿瘤模型是在胚胎发育期间人为改变癌基因或抑癌基因的表达水平，其肿瘤的发生比人类肿瘤实际发生的时间要早，并且肿瘤发生的动态学变化与人类肿瘤也不尽相同，因此，需要引进新的技术以建立与人类肿瘤更为接近的动物肿瘤模型。Cre-loxP 技术在动物肿瘤模型中的运用正是为解决这些问题而发展起来的。Zhu et al (2005)通过 Cre-loxp 技术实现了条件性基因敲除小鼠胶质瘤模型，通过 Cre 重组酶介导抑癌基因 *NF-1* 和 *p53* 的缺失，胶质纤维酸性蛋白 (glial fibrillary acidic protein, GFAP)启动子控制基因只能在特异性的胶质细胞中表达，该小鼠(*GFAP*-cre/*NF-*$1^{f/+}$/$p53^{-/+}$)模型可条件性控制后天性胶质瘤的发生(早期诱导 II 级胶质瘤，随后发展为 III 级胶质瘤，最后发展为 IV 级)。Kwon et al（2008)发现，在 *GFAP*-cre/*NF-* $1^{f/+}$/$p53^{-/+}$ 小鼠基础上，条件性敲除 *pTen*(*GFAP*- cre/*NF-*$1^{f/+}$/$p53^{-/+}$/$pTen^{f/+}$)，可直接诱导 IV 级恶性胶质瘤的发生。随着实验技术的不断更新，之后又出现了 Nestin-CreER 介导的特异性靶向神经

干细胞的胶质瘤小鼠模型 Nestin-creER/ *NF-1*$^{f/+}$/*p53*$^{-/+}$/*pTen*$^{f/+}$。Nestin 蛋白是神经干细胞的特征性分子标记，在他莫昔芬(tamoxifen)处理下，可使 CreER 进入细胞核内，介导 loxp 位点的重组，在新生小鼠及成年小鼠的脑室下区(sub-ventricular zone , SVZ)可诱导肿瘤的 100%发生(分别为 12/12、12/12)(Chen et al, 2009; Llaguno et al, 2009)。采用转基因的方法，通过不同癌基因和抑癌基因的组合，可建立不同类型的小鼠脑胶质瘤模型(Sughrue et al, 2009)，表 1 总结了目前主要的几种转基因胶质瘤模型。

表 1 转基因胶质瘤小鼠模型

Tab. 1 The glioma model of transgeneic mice

肿瘤类型 Tumor classification	基因表型 Genetics	参考文献 Reference
High-grade astrocytoma	RasB8 mice based-EGRFvIII/pTen$^{-/-}$	Wei et al, 2006
Low-grade astrocytoma	EGRFvIII/pTen$^{-/-}$	Li et al, 2009
High-grade glioma	EGFRvIII/Ink4a/Arf$^{-/-}$	Bachoo et al, 2002
GBM	EGFRvIII/Ink4a/Arf$^{-/-}$/pTen$^{-/-}$	Zhu et al, 2009
Malignant astrocytoma	NF-1$^{+/-}$/p53$^{+/-}$	Reilly et al, 2000
High-grade astrocytoma	NF-1$^{+/-}$/p53$^{+/-}$/pTen$^{-/-}$	Kwon et al, 2008
Oligodendroglioma	v-erbB/EGFRvIII	Weiss et al, 2003
Oligodendroglioma	v-Ras/EGFRvIII	Ding et al, 2003

病毒介导的胶质瘤模型，根据使用载体的不同又可分为腺病毒介导(Ahmed et al, 2011; Llaguno et al, 2009; Zhu et al, 2009)、逆转录病毒介导(Li et al, 2009; Uhrbom & Holland, 2001)和慢病毒介导(de Vries et al, 2010; Marumoto et al, 2009)胶质瘤模型。三种载体各有其优缺点：腺病毒载体具有高效传递和表达基因的能力，但腺病毒自身具有的非特异致瘤性限制了其应用；逆转录病毒基因组能稳定地整合至宿主基因组中，但其宿主范围较窄，只能感染分裂细胞；慢病毒载体是目前应用前景较好的转基因载体，该载体不仅能将外源基因有效地整合到靶细胞基因组内，而且可以感染各种非分裂细胞。Holland et al (2000)通过逆转录病毒 RCAS-TVA 系统激活小鼠大脑中 *Ras* 和 *Akt* 的表达，可实现目标基因在胶质细胞中的靶向性表达；Marumoto et al (2009)通过慢病毒载体介导 *Ras* 的表达或 *Akt* 的激活，它们的表达受到 Cre 重组酶的控制，将病毒注入 GFAP-Cre 基因小鼠海马区或脑室下区(sub-ventricular zone, SVZ)，可导致 GBM 的发生，但如果将病毒注射在大脑皮层，则无法产生脑胶质瘤；Jacques et al(2010)通过腺病毒载体 GFAP-Cre 系统灭活 *Rb*、*p53* 和（或）*pTen* 基因在 *GFAP* 表达的胶质细胞中表达，同样也建立了胶质瘤的小鼠模型。

运用转基因方法建立的胶质瘤小鼠模型，可按照人们意愿在分子水平和细胞水平对动物的遗传物质进行改变，动物遗传背景清楚，可模拟出临床上由各类因素引起的基因变异而导致的胶质瘤，在病因学上更接近于脑胶质瘤的自然发生过程，为肿瘤的发生、发展及治疗提供了良好的研究材料。

4 讨论与展望

肿瘤的发生往往是由于染色体畸变、碱基缺失或突变，或者肿瘤相关基因表观修饰改变导致。TCGA 通过对胶质母细胞瘤患者样本的分析发现，大多数胶质母细胞瘤患者的肿瘤组织中存在 *PTK/Ras/PI3K*、*p53* 和 *Rb* 等基因的突变，而 *p53*、*pTen*、*EGFR*、*CDKN2A/2B* 和 *NF-1* 是突变最频繁的基因。正是这些基因突变的发现，为研究者建立转基因胶质瘤动物模型提供了重要的分子基础。

目前建立脑胶质瘤的方法有诱发型、移植型和转基因型三类，虽然前两种方法的运用时间较长，获得的动物模型目前使用比较广泛，但却各有其局限性而限制了它们的应用范围。各种模型的适用范围及优缺点见表 2。相对来说，转基因动物模型具

表 2 三种肿瘤动物模型优缺点比较

Tab. 2 The comparison of three animal tumor models

模型分类 Classification	亚类 Sub-classification	适用范围 Application	优点 Advantage	缺点 Disadvantage
诱导模型	化学诱导	移植试验	病程与人类肿瘤相似	遗传背景不清楚
	病毒诱导	肿瘤的放疗化疗		
移植模型	同种移植	抗肿瘤新药筛选	瘤株易以保存	肿瘤生长不稳定
	异种移植	肿瘤的放疗化疗	一致性较好	
转基因模型	转基因小鼠	临床抗肿瘤药物的药物评估	遗传背景清楚，分子机制明确	基因拷贝数不可控
	病毒载体介导	肿瘤的免疫疗法及疫苗研究	表达系统稳定，免疫原性小	组织特异性注射难度教大

有分子机制明确、建立系统稳定、重复性好等优点，随着分子生物学技术的不断完善，转基因动物胶质瘤动物模型的优势体现得越来越充分，尤其是慢病毒介导的胶质瘤动物模型，其载体构建简单，表达系统稳定性强，免疫原性小，是一类很有发展潜力的转基因方法。转基因动物模型缺点是组织特异性注射难度比较大，而靶向转基因小鼠因具有其独特的优势，因此，需结合两种方法使用。

脑胶质瘤动物模型的运用为临床上治疗人类胶质瘤的前期研究提供了重要信息，虽然动物模型能在很大程度上模拟人类胶质瘤的发生，但目前的研究结果表明，动物肿瘤模型与人类胶质瘤的发病机理始终有所差异，在抗肿瘤药物筛选上，很多抗肿瘤药物对模式胶质瘤动物有很好的疗效，但在人体上却收效甚微。这就提醒着我们还需要不断开发建立动物脑胶质瘤模型的新技术，研制出更高质量的动物脑胶质瘤模型，例如胶质瘤猴模型，在建立动物模型时考虑人胶质瘤的细胞起源和癌症基因组学进展等，使动物脑胶质瘤模型尽量接近人类胶质瘤发生，最终攻克胶质瘤这一顽症。

参考文献：

A hmed AU, Thaci B, Alexiades NG, Han Y, Qian S, Liu FF, Balyasnikova IV, Ulasov IY, Aboody KS, Lesniak MS. 2011. Neural stem cell-based cell carriers enhance therapeutic efficacy of an oncolytic adenovirus in an orthotopic mouse model of human glioblastoma[J]. *Mol Ther,* **19**(9): 1714-1726.

Aldape KD, Ballman K, Furth A, Buckner JC, Giannini C, Burger PC, Scheithauer BW, Jenkins RB, James CD. 2004. Immunohistochemical detection of EGFRvIII in high malignancy grade astrocytomas and evaluation of prognostic significance[J]. *J Neuropathol Exp Neurol,* **63**(7): 700-707.

Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, Sharpless NE, Chan SS, You MJ, Tang Y, DeFrances J, Stover E, Weissleder R, Rowitch DH, Louis DN, DePinho RA. 2002. Epidermal growth factor receptor and *Ink4a/Arf*: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis[J]. *Cancer Cell*, **1**(3): 269-277.

Bao SD, Wu QL, McLendon RE, Hao YL, Shi Q, Hjelmeland AB, Dewhirst MW, Bigner DD, Rich JN. 2006. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response[J]. *Nature,* **444**(7120): 756-760.

Bleau AM, Howard BM, Taylor LA, Gursel D, Greenfield JP, Lim Tung HY, Holland EC, Boockvar JA. 2008. New strategy for the analysis of phenotypic marker antigens in brain tumor-derived neurospheres in mice and humans[J]. *Neurosurg Focus,* **24**(3-4): E28.

Branle F, Lefranc F, Camby I, Jeuken J, Geurts-Moespot A, Sprenger S, Sweep F, Kiss R, Salmon I. 2002. Evaluation of the efficiency of chemotherapy in in vivo orthotopic models of human glioma cells with and without 1p19q deletions and in C6 rat orthotopic allografts serving for the evaluation of surgery combined with chemotherapy[J]. *Cancer,* **95**(3): 641-655.

Candolfi M, Curtin JF, Nichols WS, Muhammad AG, King GD, Pluhar GE, McNiel EA, Ohlfest JR, Freese AB, Moore PF, Lerner J, Lowenstein PR, Castro MG. 2007. Intracranial glioblastoma models in preclinical neuro-oncology: neuropathological characterization and tumor progression[J]. *J Neurooncol,* **85**(2): 133-148.

Cancer Genome Atlas Research Network. 2008. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways[J]. *Nature,* **455**(7216): 1061-1068.

Chen J, Kwon CH, Lin L, Li YJ, Parada LF. 2009. Inducible site-specific recombination in neural stem/progenitor cells[J]. *Genesis,* **47**(2): 122-131.

Copeland DD, Talley FA, Bigner DD. 1976. The fine structure of intracranial neoplasms induced by the inoculation of avian sarcoma virus in neonatal and adult rats[J]. *Am J Pathol,* **83**(1): 149-176.

de Vries NA, Beijnen JH, van Tellingen O. 2009. High-grade glioma mouse models and their applicability for preclinical testing[J]. *Cancer Treat Rev,* **35**(8): 714-123.

de Vries NA, Bruggeman SW, Hulsman D, de Vries HI, Zevenhoven J, Buckle T, Hamans BC, Leenders WP, Beijnen JH, van Lohuizen M, Berns AJM, van Tellingen O. 2010. Rapid and robust transgenic high-grade glioma mouse models for therapy intervention studies[J]. *Clin Cancer Res,* **16**(13): 3431-3441.

Ding H, Shannon P, Lau N, Wu XL, Roncari L, Baldwin RL, Takebayashi H, Nagy A, Gutmann DH, Guha A. 2003. Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model[J]. *Cancer Res,* **63**(5): 1106-1113.

Du W, Chen MQ, Wu ZP. 2005. The research progress of mice tumor model[J]. *Chn J Pract Med,* **4**(11): 1120-1122. [杜伟, 陈明清, 吴治平. 2005. 建立小鼠肿瘤模型的研究进展[J]. 中华医学实践杂志, **4**(11): 1120-1122.]

Furnari FB, Fenton T, Bachoo RM, Mukasa A, Stommel JM, Stegh A, Hahn WC, Ligon KL, Louis DN, Brennan C, Chin L, DePinho RA, Cavenee WK. 2007. Malignant astrocytic glioma: genetics, biology, and paths to treatment[J]. *Genes Dev,* **21**(21): 2683-2710.

Galli R, Binda E, Orfanelli U, Cipelletti B, Gritti A, De Vitis S, Fiocco R, Foroni C, Dimeco F, Vescovi A. 2004. Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma[J]. *Cancer Res,* **64**(19): 7011-7021.

Ghods AJ, Irvin D, Liu GT, Yuan XP, Abdulkadir IR, Tunici P, Konda B, Wachsmann-Hogiu S, Black KL, Yu JS. 2007. Spheres isolated from 9L gliosarcoma rat cell line possess chemoresistant and aggressive cancer stem-like cells[J]. *Stem Cells,* **25**(7): 1645-1653.

Holland EC, Celestino J, Dai CK, Schaefer L, Sawaya RE, Fuller GN. 2000. Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice[J]. *Nat Genet,* **25**(1): 55-57.

Jacques TS, Swales A, Brzozowski MJ, Henriquez NV, Linehan JM, Mirzadeh Z, O'Malley C, Naumann H, Alvarez-Buylla A, Brandner S. 2010. Combinations of genetic mutations in the adult neural stem cell compartment determine brain tumour phenotypes[J]. *EMBO J,* **29**(1): 222-235.

Kish PE, Blaivas M, Strawderman M, Muraszko KM, Ross DA, Ross BD, McMahon G. 2001. Magnetic resonance imaging of ethyl-nitrosourea-induced rat gliomas: a model for experimental therapeutics of low-grade gliomas[J]. *J Neurooncol,* **53**(3): 243-257.

Koestner A. 1990. Characterization of N-nitrosourea-induced tumors of the

nervous system; their prospective value for studies of neurocarcinogenesis and brain tumor therapy[J]. *Toxicol Pathol,* **18**(2): 186-192.

Kondo T, Setoguchi T, Taga T. 2004. Persistence of a small subpopulation of cancer stem-like cells in the C6 glioma cell line[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **101**(3): 781-786.

Krynska B, Otte J, Franks R, Khalili K, Croul S. 1999. Human ubiquitous JCV(CY) T-antigen gene induces brain tumors in experimental animals[J]. *Oncogene,* **18**(1): 39-46.

Kwon CH, Zhao DW, Chen J, Alcantara S, Li YJ, Burns DK, Mason RP, Lee EYHP, Wu H, Parada LF. 2008. *Pten* haploinsufficiency accelerates formation of high-grade astrocytomas[J]. *Cancer Res,* **68**(9): 3286-3294.

Lee J, Kotliarova S, Kotliarov Y, Li AG, Su Q, Donin NM, Pastorino S, Purow BW, Christopher N, Zhang W, Park JK, Fine HA. 2006. Tumor stem cells derived from glioblastomas cultured in bFGF and EGF more closely mirror the phenotype and genotype of primary tumors than do serum-cultured cell lines[J]. *Cancer Cell,* **9**(5): 391-403.

Li L, Dutra A, Pak E, Labrie JE III, Gerstein RM, Pandolfi PP, Recht LD, Ross AH. 2009. EGFRvIII expression and PTEN loss synergistically induce chromosomal instability and glial tumors[J]. *Neuro Oncol,* **11**(1): 9-21.

Llaguno SA, Chen J, Kwon CH, Jackson EL, Li YJ, Burns DK, Alvarez-Buylla A, Parada LF. 2009. Malignant astrocytomas originate from neural stem/progenitor cells in a somatic tumor suppressor mouse model[J]. *Cancer Cell,* **15**(1): 45-56.

London WT, Houff SA, Madden DL, Fuccillo DA, Gravell M, Wallen WC, Palmer AE, Sever JL, Padgett BL, Walker DL, ZuRhein GM, Ohashi T. 1978. Brain tumors in owl monkeys inoculated with a human polyomavirus (JC virus)[J]. *Science,* **201**(4362): 1246-1249.

Maes W, Van Gool SW. 2011. Experimental immunotherapy for malignant glioma: lessons from two decades of research in the GL261 model[J]. *Cancer Immunol Immunother,* **60**(2): 153-160.

Marumoto T, Tashiro A, Friedmann-Morvinski D, Scadeng M, Soda Y, Gage FH, Verma IM. 2009. Development of a novel mouse glioma model using lentiviral vectors[J]. *Nat Med,* **15**(1): 110-116.

Parsa AT, Chakrabarti I, Hurley PT, Chi JH, Hall JS, Kaiser MG, Bruce JN. 2000. Limitations of the C6/Wistar rat intracerebral glioma model: implications for evaluating immunotherapy[J]. *Neurosurgery,* **47**(4): 993-1000.

Pellegatta S, Poliani PL, Corno D, Menghi F, Ghielmetti F, Suarez-Merino B, Caldera V, Nava S, Ravanini M, Facchetti F, Bruzzone MG, Finocchiaro G. 2006. Neurospheres enriched in cancer stem-like cells are highly effective in eliciting a dendritic cell-mediated immune response against malignant gliomas[J]. *Cancer Res,* **66**(21): 10247-10252.

Radaelli E, Ceruti R, Patton V, Russo M, Degrassi A, Croci V, Caprera F, Stortini G, Scanziani E, Pesenti E, Alzani R. 2009. Immunohistopathological and neuroimaging characterization of murine orthotopic xenograft models of glioblastoma multiforme recapitulating the most salient features of human disease[J]. *Histol Histopathol,* **24**(7): 879-891.

Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, McLaughlin ME, Jacks T. 2000. *Nf1;Trp53* mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects[J]. *Nat Genet,* **26**(1): 109-113.

Stojiljkovic M, Piperski V, Dacevic M, Rakic L, Ruzdijic S, Kanazir S. 2003. Characterization of 9L glioma model of the Wistar rat[J]. *J Neurooncol,* **63**(1): 1-7.

Sughrue ME, Yang I, Kane AJ, Rutkowski MJ, Fang SN, James CD, Parsa AT. 2009. Immunological considerations of modern animal models of malignant primary brain tumors[J]. *J Transl Med,* **7**(1): 84.

Tabuchi K, Nishimoto A, Matsumoto K, Satoh T, Nakasone S, Fujiwara T, Ogura H. 1985. Establishment of a brain-tumor model in adult monkeys[J]. *J Neurosurg*, **63**(6): 912-916.

Uhrbom L, Holland EC. 2001. Modeling gliomagenesis with somatic cell gene transfer using retroviral vectors[J]. *J Neurooncol,* **53**(3): 297-305.

Watanabe T, Yokoo H, Yokoo M, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. 2001. Concurrent inactivation of RB1 and TP53 pathways in anaplastic oligodendrogliomas[J]. *J Neuropathol Exp Neurol,* **60**(12): 1181-1189.

Wei QX, Clarke L, Scheidenhelm DK, Qian BP, Tong A, Sabha N, Karim Z, Bock NA, Reti R, Swoboda R, Purev E, Lavoie JF, Bajenaru ML, Shannon P, Herlyn D, Kaplan D, Henkelman RM, Gutmann DH, Guha A. 2006. High-grade glioma formation results from postnatal pten loss or mutant epidermal growth factor receptor expression in a transgenic mouse glioma model[J]. *Cancer Res,* **66**(15): 7429-7437.

Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, Aldape K, Hill JR, Kuriyama H, Kuriyama N, Milshteyn N, Roberts T, Wendland MF, DePinho R, Israel MA. 2003. Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma[J]. *Cancer Res,* **63**(7): 1589-1595.

Yuan XP, Curtin J, Xiong YZ, Liu GT, Waschsmann-Hogiu S, Farkas DL, Black KL, Yu JS. 2004. Isolation of cancer stem cells from adult glioblastoma multiforme[J]. *Oncogene,* **23**(58): 9392-9400.

Zhu HH, Acquaviva J, Ramachandran P, Boskovitz A, Woolfenden S, Pfannl R, Bronson RT, Chen JW, Weissleder R, Housman DE, Charest A. 2009. Oncogenic EGFR signaling cooperates with loss of tumor suppressor gene functions in gliomagenesis[J]. *Proc Natl Acad Sci USA,* **106**(8): 2712-2716.

Zhu Y, Guignard F, Zhao DW, Liu L, Burns DK, Mason RP, Messing A, Parada LF. 2005. Early inactivation of p53 tumor suppressor gene cooperating with NF1 loss induces malignant astrocytoma[J]. *Cancer Cell,* **8**(2): 119-130.

Zhu Y, Parada LF. 2002. The molecular and genetic basis of neurological tumours[J]. *Nat Rev Cancer,* **2**(8): 616-626.



DONGWUXUE YANJIU

双月刊(双月8日出版)，1980年创刊
Bimonthly, started in 1980
第33卷第3期，Vol.33 No.3

ZOOLOGICAL RESEARCH

编　　辑　《动物学研究》编辑部
[650223　昆明市教场东路32号　中国科学院昆明动物研究所　电话：(0871)5199026　传真：(0871)5113532　zoores@mail.kiz.ac.cn]
主　　编　张亚平
主 办 单 位　中国科学院昆明动物研究所　中国动物学会©
主 管 单 位　中国科学院
出 版 单 位　科学出版社（北京东黄城根北街16号　邮编100717）
印 刷 装 订　昆明小松制版印刷有限公司(昆明市北京路402号建设大厦15楼　邮编650031)
国内总发行　云南省邮政公司报刊发行局（昆明市吴井路139号　邮编650011）
订　购　处　全国各地邮政局
国外总发行　中国国际图书贸易总公司（中国国际书店）(北京399信箱　邮编100044)
广告经营许可证：滇工商广字66号

Edited by Editorial Office of Zoological Research
(Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, 32 Jiaochang Donglu, Kunming, Yunnan, Post Code: 650223　Tel: +86 871 5199026　Fax: +86 871 5113532
E-mail: zoores@mail.kiz.ac.cn　Website: http://www.zoores.ac.cn)

Editor-in-Chief: ZHANG Ya-Ping

Sponsored by Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences; China Zoological Society©

Published by Science Press (16 Donghuangchenggen Beijie, Beijing 100717, China)

Printed by Kunming Xiaosong Plate Making & Printing Co, Ltd

Subscribed to all local post offices in China

Domestic distributed by Yunnan Post

International distributed: China International Book Trading Corporation (Guoji Shudian) P.O.BOX 399, Beijing 100044, China

国内外公开发行　刊号：ISSN 0254-5853 / CN 53-1040/Q

国内邮发代号：64—20　国外发行代号：BM358
定价：¥40.00　Post No：BM358